



PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 15/87, 15/85, C07K 14/195, C12N 1/21, C12R 1/01, A01K 67/027, A61K 48/00		A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/29884
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 17. Juni 1999 (17.06.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/08096		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 11. Dezember 1998 (11.12.98)		Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	
(30) Prioritätsdaten: 197 54 938.1 11. Dezember 1997 (11.12.97) DE			
(71)(72) Anmelder und Erfinder: VON EICHEL-STREIBER, Christoph [DE/DE]; Bingerweg 15, D-55444 Schwanheim (DE). CHAKRABORTY, Trinad [SG/DE]; Seltersweg 85, D-35390 Giessen (DE).			
(74) Anwalt: KEIL & SCHAAFHAUSEN; Cronstetten Strasse 66, D-60322 Frankfurt am Main (DE).			
(54) Title: TGC METHOD FOR INDUCTING TARGETED SOMATIC TRANSGENESIS			
(54) Bezeichnung: TGC-VERFAHREN ZUR INDUKTION EINER ZIELGERICHTETEN, SOMATISCHEN TRANSGENITÄT			
(57) Abstract			
Disclosed is a TGC method for inducing targeted somatic transgenesis in an animal host, whereby bacteria with a foreign DNA integrated into an episomal vector release, under the control of eukaryotic regulatory elements for ulterior transcription and expression, said foreign DNA in the case of infection of a foreign organism, organ, tissue, cell line or individual cells, causing transcription and expression of foreign DNA and/or foreign protein in said location.			
(57) Zusammenfassung			
Es wird ein TGC-Verfahren zur Induktion einer zielgerichteten somatischen Transgenität in einem animalen Wirt beschrieben, bei dem Bakterien mit einer in einen episomalen Vektor integrierten und unter der Kontrolle eukaryonten, regulatorischen Elementen zur späteren Transkription und Expression stehender Fremd-DNA bei der Infektion eines fremden Organismus, eines Organs, eines Gewebes einer Zelllinie oder einzelner Zellen die Fremd-DNA freisetzen und damit dort die Transkription und Expression von Fremd-DNA und/oder Fremd-Protein bewirken.			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauritanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PL	Polen		
CN	China	KZ	Kasachstan	PT	Portugal		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LJ	Liechtenstein	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SE	Schweden		
EE	Estland			SG	Singapur		

- 1 -

5 **TGC-Verfahren zur Induktion einer zielgerichteten, somatischen
Transgenität**

10 Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Induktion einer
zielgerichteten, somatischen Transgenität (TGC = targeted
genetic conditioning), das zur Expression von Fremdproteinen
in Zellen, einem Gewebe, einem Organ oder einem ganzen
Wirtsorganismus sowie zur somatischen Gentherapie eingesetzt
15 wird.

Es ist bekannt, daß Proteine für technische Anwendungen oder
für therapeutische Zwecke durch den Transfer von Genen in
Mikroorganismen oder Säugetierzellen in ausreichenden Mengen
20 exprimiert werden können. Diese Verfahren sind besonders
bedeutsam für körpereigene Proteine, die sonst nicht oder nur
begrenzt zugänglich sind, wie Hormone, Regulationsfaktoren,
Enzyme, Enzyminhibitoren und humanisierte monoklonale
Antikörper sowie für die Herstellung von Oberflächenproteinen
25 pathogener Mikroorganismen oder viraler Hüllproteine zur
gefährlosen Herstellung diagnostischer Tests und verträglicher
Impfstoffe. Durch "Protein-Engineering" können auch neuartige
Proteine hergestellt werden, die durch Fusion, Mutation oder
Deletion entsprechender DNA-Sequenzen anwendungs-optimierte
30 Eigenschaften erhalten, zum Beispiel Immuntoxine.

Aus menschlichen Zellen gewonnene Gene sind auch in Maus-,
Ratten- oder Schafzellen funktionsfähig und führen dort zur
Bildung entsprechender Genprodukte. Dies wurde bereits
35 praktisch bei der Herstellung von therapeutischen Proteinen,

- 2 -

zum Beispiel in der Milch transgener Nutztiere, angewendet. Der bisher bekannte Weg hierfür ist die Mikroinjektion entsprechender Fremd-DNA-tragender Vektoren in den Kern der befruchteten Eizelle, in der bei einer Ausbeute von 1% die DNA 5 dann in das Chromosom eingebaut wird. Die transgene befruchtete Eizelle wird anschließend hormonell stimulierten Muttertieren reimplantiert. Ein Nachkomme, der das eingeschleuste Gen in allen Körperzellen trägt, ist die Grundlage für die Bildung einer "transgenen Herde". Durch die Nutzung 10 der Gentechnik ist es möglich geworden, landwirtschaftliche Nutztiere so gezielt zu verändern, daß sie menschliche Proteine in ihrem Blut, ihrem Gewebe oder der Milch produzieren, die in Mikroorganismen oder Pflanzen nicht hergestellt werden können.

15

Der Einsatz von transgenen Tieren als Proteinproduktionsfabriken hat jedoch den entscheidenden Nachteil, daß hierzu ein Eingriff in die Keimbahn der Tiere erforderlich ist. Wegen des hohen technischen und zeitlichen Aufwandes zur Schaffung 20 und Züchtung von transgenen Tieren und auch wegen der Diskussion über die ethischen Konsequenzen dieser Methoden sind alternative Methoden zur Proteinproduktion in einem animalen Wirt ohne Keimbahneingriff erforderlich und wären von sehr großem Vorteil.

25

Es ist weiterhin bekannt, daß die Milch von Säugetieren wie Kühen, Schafen, Ziegen, Pferden oder Schweinen eine Reihe von bakteriellen Krankheitserregern enthalten kann. Darunter sind Listerien, Mykobakterien, Brucellen, Rhodococcus, Salmonellen, 30 Shigellen, Escherichia, Aeromonaden und Yersinien, oder generell Bakterien mit intrazellulärem Lebensstil [1, 2]. Diese Bakterien werden im wesentlichen durch orale Aufnahme auf den Menschen oder das Tier übertragen [3], aber auch Tröpfcheninfektionen spielen eine Rolle. Eine Hauptquelle für 35 die Infektion des Menschen mit Listerien [4], Mykobakterien

- [5] und *Escherichia coli* ist kontaminierte Milch [6]. Der Mensch nimmt die Bakterien beim Verzehr nicht pasteurisierter Milch oder Milchprodukte auf. Die anderen oben aufgeführten Bakteriengattungen wie Salmonellen, Shigellen, Yersinien, 5 Rhodococcus und Brucellen werden in ähnlicher Weise auf den Menschen übertragen. Bakterien können aber auch durch andere mit Bakterien infizierte Tierprodukte aus der Kuh, der Ziege, dem Schaf, dem Hasen, dem Pferd, dem Schwein oder dem Geflügel in den Menschen gelangen.
- 10 Die Infektion der Tiere erfolgt dabei oft über mukosale Oberflächen, sehr häufig über den Verdauungstrakt. Nach der Aufnahme von Bakterien werden zum Beispiel im Fall von Listerien jedoch nicht alle Gewebe symptomatisch infiziert.
- 15 Bei der Kuh und bei der Ziege steht die Infektion von Euter, Milz und Leber im Vordergrund des Infektionsgeschehens. Bei Schafen kann es außerdem auch zur Erkrankung des zentralen Nervensystems in Form der Meningitis kommen, so daß nicht alle Tiere die Infektion überleben. Mit der Infektion des Euters 20 ist die Infektionskette geschlossen. Mit kontaminiertem Milch aufgenommene Bakterien können dann das Tier, zum Beispiel das saugende Kalb, oder den Menschen über den Verdauungstrakt neu infizieren.
- 25 Über den Weg der bakteriellen Infektion des Menschen, hier speziell dargestellt am Beispiel der Listerien, ist derzeit folgendes bekannt:
- Für den Menschen sind von den sechs bekannten *Listeria*-Spezies 30 lediglich *L.monocytogenes* und *L.ivanovii* [7] pathogen. Die Erkrankung des Menschen erfolgt beim Verzehr infizierter Milch oder Milchprodukte. Der Verlauf der Infektion hängt vom Gesundheitszustand des Menschen ab und ist in aller Regel undramatisch. In der Schwangerschaft kann es zu der intrauterinen Übertragung des Keims auf den Fetus kommen,

verbunden mit Fehl-, Tod- oder Frühgeburten. In allen Fällen besteht eine exzellente und problemlose Behandelbarkeit mit Antibiotika wie Ampicillin oder Erythromycin [8; 8a].

- 5 Für *L.monocytogenes* in Mensch und Tier, für *L.ivanovii* im Schaf, ist der Weg in die Zelle gut definiert. Zur vollen Pathogenität der Listerien sind eine Reihe von Pathogenitätsfaktoren notwendig. Dazu gehört PrfA (positive regulator of virulence), ActA (actin nucleating protein), PlcA (phosphatidylinositol-specific phospholipase), PlcB (phosphatidylcholine-specific phospholipase), Hly (listeriolysin), Mpl (metalloprotease) [9]. Die Zellspezifität der Pathogen-Wirtszelle-Interaktion wird über eine Reihe von Proteinen vermittelt. Dazu gehören die Internaline InlA und InlB, die am initialen Kontakt und der Interaktion von Bakterien und Zelloberfläche beteiligt sind [10, 11]. *L.monocytogenes* kann in der experimentellen Situation unter anderem Endothelzellen, Epithelzellen, Fibroblasten und Hepatozyten infizieren. Darüber hinaus infiziert *L.monocytogenes* mit neutrophilen Granulocyten, Makrophagen und Lymphozyten auch Zellen des weißen Blutbildes. Dies ist ein wesentlicher Faktor bei der Übertragung der Bakterien von der Eintrittspforte zum Zielorgan im Wirt. Schließlich kann auch das Lungengewebe durch Listerien infiziert werden, wenn man die Bakterien über Tröpfcheninfektion appliziert.

- Nach der Adhäsion an der Zelloberfläche wird *L.monocytogenes* durch Endozytose in die Zelle eingeschleust, zerstört unter der Einwirkung von Listeriolysin (Hly) die Endosomenmembran und wird so in das Zellzytosol freigesetzt [14]. In der Zelle angekommen, kann sich der Keim vermehren. Unter der Produktion weiterer Proteine bleibt das vollpathogene Bakterium nicht ortsständig, sondern bewegt sich aktiv fort. Die Fortbewegung wird durch die Ausnutzung einer Reihe von *L.monocytogenes* eigenen und einiger zelleigener Proteine bewerkstelligt [15,

- 5 -

16]. ActA wird auf der Zelloberfläche der L.monocytogenes exprimiert. Es bindet das zelluläre Protein VASP, das seinerseits die Brücke zur Anheftung von zellulären Aktin bildet. Im weiteren Verlauf bilden sich Aktinschweife aus, die 5 das Bakterium an seiner Spitze tragen und es so durch die Zelle weiterbewegen. Trifft L.monocytogenes auf die Zellmembran, so entsteht eine Membranprotrusion, die bei benachbarten Zellen direkt in die Nachbarzelle hineinragt. Diese Ausstülpung wird dann von der Nachbarzelle endozytiert, so daß 10 L.monocytogenes sich in der neuen Zelle innerhalb einer zweifachen Membran befindet. Die beiden Membranen werden unter Einwirkung von Hly und PlcB aufgelöst [17]. Am Ende dieses Vorganges hat L.monocytogenes auch die Nachbarzelle infiziert und der Infektionsprozeß beginnt von Neuem. So gelangt 15 L.monocytogenes unter anderem in die sekretorischen Zellen des Euters wie der Kuh. Sekretierte Listerienproteine werden in der Milch nachweisbar, d.h. sie werden intrazellulär aus der laktierenden Zelle in die Milch abgegeben [18]. Zu diesen Proteinen zählen mit Hly (Listeriolysin) und IrpA (internalin related protein [19]) zwei Pathogenitätsfaktoren, die von 20 L.monocytogenes im Wirt in großen Mengen produziert, sezerniert und in die Milch ausgeschieden werden [20].

Diese Kenntnisse des Infektionsprozesses haben es ermöglicht, 25 L.monocytogenes genetisch so zu verändern, daß er fremde Proteine exprimiert. Beispiele für die Expression fremder Proteine in L.monocytogenes sind: Alkalische Phosphatase aus Escherichia coli, das Nucleoprotein aus dem Lymphochoriomeningitis virus (LCMV), das Nucleoprotein aus dem Influenza virus, 30 das "major capsid protein" (L1) aus cottontail rabbit papillomavirus (CRPV) und das Gag Protein aus HIV Typ 1 [20 bis 27].

Neben Proteinen prokaryonten Ursprungs handelt es sich hierbei 35 um virale Proteine, die normalerweise nicht innerhalb der

eukaryonten Zelle produziert werden. Solche und ähnliche Fremdproteine prokaryonten und eukaryonten Ursprungs können von *L.monocytogenes* produziert werden, ohne daß eine eukaryonte Zelle dazu notwendig ist. Von *L.monocytogenes* produzierten Proteine werden in der Milch ausgeschieden.

Die Infektion durch Bakterien erfolgt durch spezifische Interaktionen von Liganden-Proteinen der Bakterien mit Rezeptor-Proteinen der Zielzellen. Hieran ist im Falle von *L.monocytogenes* die Internalinfamilie maßgeblich beteiligt; sie bestimmt im wesentlichen die Zellspezifität des Infektionsprozesses [28]. Zudem wird eine ActA abhängige Zellaufnahme diskutiert, die über Rezeptoren der Heparansulfatfamilie vermittelt wird [29]. Infiziert *L.monocytogenes* die Zelle, so kommt es nicht in jedem Fall zu einem vollen Infektionszyklus. Wird in *L.monocytogenes* Listeriolysin ausgeschaltet, so bleiben die Bakterien im Endosom stecken und die Infektion der "ersten Zelle" kommt nicht zu Stande. Bakterien, in denen das Protein ActA ausgeschaltet, inaktiv oder nicht mehr vorhanden ist, kommen in die erstinfizierten Zellen, bleiben aber dort stecken und können die Nachbarzellen nicht mehr infizieren [30, 31]. Bei der Ausschaltung der PclB ist der Keim nicht mehr in der Lage, sich in einer zweiten Zelle zu etablieren.

L.monocytogenes ist ein Bakterium, das durch eine Reihe von Antibiotika behandelt werden kann. Besonders geeignet sind Ampicillin und Penicillin (jeweils in Kombination mit Gentamycin). Als Alternative werden auch Erythromycin und Sulfonamide eingesetzt. In besonderen Fällen kommen Tetrazykline, Vancomycin oder Chloramphenicol zum Einsatz [32]. Entsprechende Behandlungsmöglichkeiten bestehen auch für andere Bakterien [8a] der Gattungen *Aeromonas*, *Bartonella*, *Brucella*, *Campylobacter*, *Enterobacteriaceae*, *Mycobacterium*, *Renibacterium*, *Rhodococcus* oder andere Bakterien, die mit dem genannten Bakterien genetisch oder biochemisch verwandt sind.

Unter Berücksichtigung dieser Erkenntnisse stellte sich nun die Aufgabe, eine bakterielle Infektion für ein Verfahren zur organotropen Proteinproduktion zu nutzen.

- 5 Gelöst wird diese Aufgabe durch das ein TGC-Verfahren zur Induktion einer zielgerichteten, somatischen Transgenität, bei dem Bakterien, die eine Fremd-DNA tragen, welche in einem episomalen Vektor integriert und zur späteren Transkription und Expression vorbereitet ist, bei der Infektion von Zellen,
10 Geweben, einem Organ oder dem ganzen Wirtsorganismus ihre genetischen Informationen in die infizierte Einzelzelle freisetzen und damit die Expression von Fremdprotein bewirken.

Dieses Verfahren kann entweder zur Gewinnung eines Fremdproteins eingesetzt werden, dient aber vorteilhaft auch zur somatischen Gentherapie, bei der die durch die bakterielle Infektion in den Wirtsorganismus eingeführte Fremd-DNA dort die Bildung eines dem Wirtsorganismus fehlenden Proteins veranlaßt oder durch die Erzeugung von einzel- oder doppelsträngiger Nukleinsäure die Bildung eines Proteins im Wirtsorganismus erhöht, vermindert oder verhindert. Dieses Verfahren kann auf alle bekannten Nutztiere und auch auf den Menschen angewendet werden.

- 25 Handelt es sich bei dem infizierten Gewebe um das Ei eines Geflügeltieres, so wird das Fremdprotein im Ei produziert und kann aus diesem durch die bekannten Verfahren der Isolierung von Proteinen, zum Beispiel aus Hühnereiern, isoliert werden. Handelt es bei den infizierten Zellen um Zellen des Blutes,
30 so kann durch parenterale Infektion der Zellen eine Verbreitung der Bakterien und mit ihnen der Fremd-DNA im injizierten Gesamtorganismus erzielt werden. Handelt es sich bei den Wirtstieren um Versuchstiere, deren infiziertes Organ ein Euter ist, so wird in der Milch des Versuchstieres das

- 8 -

gewünschte Fremdprotein produziert, aus der das Fremd-Protein dann isoliert werden kann.

Das TGC-Verfahren wird im folgenden exemplarisch für das
5 Bakterium *L.monocytogenes* besprochen. Es kann entsprechend aber auch bei allen intrazellulär wachsenden Bakterien angewendet werden, unter denen die Bakterien der Gattungen *Aeromonas*, *Bartonella*, *Brucella*, *Campylobacter*, *Clostridia*, *Enterobacteriaceae* (bei letzterer insbesondere Bakterien der
10 Spezies *Yersinia*, *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*), *Legionella*, *Mycobacterium*, *Renibacterium*, *Rhodococcus* oder Bakterien aus mit ihnen genetisch oder biochemisch verwandten Gattungen hervorzuheben sind, obwohl auch andere Bakterien-Gattungen, die nicht pathogen sind und auch keinen intrazel-
15 ulären Lebensstil haben, für das erfindungsgemäße Verfahren geeignet sind, sofern sie in einem eukaryonten Wirtsorganismus lebensfähig sind.

Es ist außerdem möglich, das TGC-Verfahren mit von Hause aus
20 apathogenen Bakterien durchzuführen, die durch genetische Manipulationen mit zusätzlichen Faktoren ausgestattet werden, die ihnen den Zutritt zur Zelle ermöglichen. Zu einer derartigen "Aufrüstung mit Pathogenitätsfaktoren" können viele von Hause aus nicht intrazellulär wachsende Bakterien
25 herangezogen werden, wie *Bacillus subtilis*, *Lactobacillen*, *Pseudomonaden*, *Staphylokokken*. Ein in diesem Sinn aufgerüsterter TGC-Sicherheitsstamm ist zum Beispiel *Bacillus subtilis*, der zusätzlich mit dem Listeriolysin aus *L.monocytogenes* ausgerüstet ist. Ein Beispiel für die Aufrüstung von apathogenen Bakterien zum TGC-Sicherheitsstamm wird mit der Ausstattung von *L.innocua* mit dem *hly* und/oder dem *actA* Gen aus *L.monocytogenes* im Beispiel 1 angegeben. Ein weiteres Beispiel ist *E.coli K12* aufgerüstet mit dem Invasingen (*inv*) aus *Yersinia pseudotuberculosis*.

Das TGC-Verfahren wird in folgenden Schritten durchgeführt:

a) Klonierung der TGC-(Fremd)-DNA:

5 Das TGC-Verfahren wird durch die Vorbereitung des L.monocytogenes Stammes im Labor eingeleitet. In einen geeigneten Vektor wird die cDNA für das herzustellende Fremdprotein insertiert. Die Einfügung der cDNA wird dabei in bekannter Weise so vorgenommen, daß die spätere Transkription und Expression im
10 eukaryontischen Wirt sichergestellt ist. Soll das Protein von der Zelle sekretiert werden, so müssen die Vektoren passende, wirtszellspezifische Signalsequenzen enthalten. Beim Vektor kann es sich um einen eukaryonten Vektor handeln, zum Beispiel um pCMV der Firma Clontech oder um pCMD der Firma Invitrogen,
15 beide käuflich zu erwerben. Als wesentliche Kriterien der Auswahlvektoren weisen diese eukaryonte Promotoren, Donor und Akzeptorstellen für das RNA-Splicing auf (fakultative Eigenschaft), sowie eine Polyadenylierungsstelle zum Beispiel aus SV40. Zur Vervielfältigung der DNA kann die Produktion der
20 genetischen Konstrukte (im folgenden als TGC-DNA bezeichnet) in E. coli oder jedem anderem geeigneten Wirtsstamm nach Methoden vorgenommen werden. Die TGC-DNA muß zur primären Klonierung lediglich in die ausgewählten Bakterien eingebracht und dann später in den ausgewählten bakteriellen TGC-Sicherheitsstamm transferiert werden können. Der Transfer in
25 L.monocytogenes kann mit den verschiedenen, wohlbekannten Methoden des Gentransfers von isolierter DNA (Transformation, Elektroporation etc.) oder durch die Vorgänge der Konjugation und der Transduktion direkt oder mittelbar von Bakterium zu
30 Bakterium vorgenommen werden.

b) TGC-Sicherheitsstämme als Rezipienten der TGC-DNA:

Als Rezipient der TGC-DNA werden besondere L.monocytogenes
35 Wirtsstämme - oder aber andere TGC-Arten, die wie L.monocyt-

- 10 -

genes intrazellulär vitale Bakterien (z.B. Yersinien), oder ins Endosom-eindringende (z.B. Salmonellen) oder aber mit zusätzlichen bakteriellen Faktoren "aufgerüstete", ansonsten nicht pathogene Bakterien (z.B. Escherichia coli oder L.innocua) darstellen - eingesetzt, die folgende Eigenschaften, einzeln oder in Kombination, erfüllen:

- (A.1) sie eignen sich als Empfänger fremder DNA (genetische Manipulierbarkeit);
- (B.1) sie tragen Mutationen, die Gene betreffen, ohne die ein Überleben der Bakterien in der Außenwelt, also außerhalb eines Wirtes, zum Beispiel bei niedrigerer Temperatur, unmöglich ist (sicherheitsrelevante Eigenschaft);
- (B.2) es sind attenuierte Wirtsstämme, bei denen ein Teil ihrer Pathogenitätsfaktoren deletiert oder inaktiviert ist, so daß sie nicht mehr die volle Pathogenität der Wildtypstämme entfalten (Attenuierung);
- (C.1) sie sind "genetische Krüppel", die durch gezielte, vom Experimentator eingeführte Stoffwechseldefekte nur auf definierten, artifiziellen Medien zur Anzucht gebracht werden können, aufgrund dieser Defekte aber in der Zelle und vor allem im Ganztier nicht mehr wachsen, sich also nicht vermehren können ("endogener Suizid");
- (C.2) sie induzieren ihre Aufnahme in Endosomen und werden in diesen Zellkompartimenten aufgelöst (Infektion über Endosomen)
- (C.3) sie werden von professionellen Phagozyten in Phagolysosomen aufgenommen, können diese Zellkom-

- 11 -

partimente jedoch auflösen (d.h. überwinden)
(Infektion über Phagolysosomen)

- 5 (C.4) die Bakterien tragen Suizidgene, die erst nach dem Eindringen in die Wirtszelle konditional aktiviert werden, so daß die Bakterien sich selbst umbringen ("exogener Suizid")
- 10 (D.1) sie sind durch Antibiotikabehandlung des späteren animalen Wirts zu eliminieren (Abtötung durch Antibiose).

Bei Punkt A.1 handelt es sich um eine allgemeine Eigenschaft der Bakterien, ohne die keine der angesprochenen genetischen
15 Manipulationen möglich wäre.

Unter den Punkten B.1 und B.2 sind Veränderungen zusammengefaßt, die die Anwendung der Bakterien sicherer machen.
Bakterien mit diesen Veränderungen können sich bei Aus-
20 scheidung in die Umwelt nicht mehr vermehren, bzw sind attenuiert (B.1), weisen eine geringeres pathogenes Potential auf (B.2). Die Veränderung von Bakterien gemäß Unterpunkt B.2 hat auch Einfluß auf die Freisetzung der Fremd-DNA in die Zelle (siehe Unterpunkte C.2 + C.3).

25 Bei den Unterpunkten C.1 - C.4 handelt es sich um genetische Veränderungen von Bakterien, die die Freisetzung der Fremd-DNA in die animale Zelle maßgeblich bestimmen. Unter den Punkten C.3 - C.4 sind Infektionswege aufgezeigt, die für Bakterien,
30 die weiter unten unter den Beispielen zusammengefaßt werden, als Weg der Übertragung der Fremd-DNA in das Zytosol der animalen Zelle identifiziert wurden.

Der unter (D.1) aufgeführte Eingriff erlaubt die gezielte
35 Abtötung der Bakterien. Dadurch wird die Freisetzung der

- 12 -

Fremd-DNA aus den Bakterien bewirkt, die Therapie mit Antibiotika ist aber auch ein sicherheitrelevanter Aspekt.

Über die Veränderungen und Eingriffe gemäß C.1 – C.4 und auch 5 B.2 und D.1 wird die Freisetzung der rekombinanten DNA in die Zelle erst ermöglicht.

Stämme mit diesen Eigenschaften (einzelnen oder in Kombination) werden als TGC-Sicherheitsstämme bezeichnet.

10

c) Optimierung der TGC-Amme auf das Zielorgan des TGC-Verfahrens:

15

Die TGC-DNA, die für das herzustellende Fremdprotein kodiert, wird in den TGC-Sicherheitsstamm durch Transformation, Konjugation oder Transduktion überführt. Die so erhaltenen Stämme werden nachfolgend als TGC-Amme bezeichnet. Die Amme versorgt (füttert) den TGC-Wirt mit der DNA und induziert damit die somatische Transgenität. Damit während des TGC-Verfahrens das gewünschte Fremdprotein optimal exprimiert wird, sollte sich das Gen vorteilhafterweise unter der Kontrolle von Promotoren und anderen regulatorisch wirkenden Sequenzen befinden, die aus dem vorher ausgewählten Zielorgan des TGC-Verfahrens stammen oder für das Zielorgan optimiert sind, zum Beispiel Euter-spezifische Promotoren und Sekretionssignale.

20

25

d) Infektion des Wirtsorganismus mit der TGC-Amme:

30

Durch die Anzucht der TGC-Amme wird sie in vitro in einem Kulturmedium vermehrt und für die Durchführung des TGC-Verfahrens in einem ausgewählten Wirtsorganismus vorbereitet. Alternativ kann die TGC-Amme auch im dem Wirtsorganismus (Mensch oder Tier, im folgenden TGC-Wirt genannt), durch in vivo Anzucht vermehrt. Als Vorbereitung für die Infektion wird

35

- die TGC-Amme in einer an den TGC-Wirt adaptierten, nicht bakteriziden Lösung, einem Puffer oder einer anderen physiologischen Flüssigkeit aufgenommen. Die Flüssigkeit wird dem TGC-Wirt, zum Beispiel dem laktierenden Säugetier, wenn das Euter somatisch transgen gemacht werden soll, verabreicht. Dies kann entweder peroral durch Trinken der Flüssigkeit oder aber durch Zuführung über eine Magensonde, den Anus oder eine andere Körperöffnung erfolgen. Als Alternative kommt die Gabe der TGC-Amme durch Injektion in Betracht, die intravenös, intramuskulär direkt in das Zielorgan oder vorzugsweise intraperitoneal erfolgt. Als weitere Alternative kann die Infektion durch Bildung eines Aerosols und anschließende Inhalation der Tröpfchen erfolgen.
- Der TGC-Wirt (Mensch oder Nutztier: Kuh, Pferd, Ziege, Schaf, Schwein, Hase, Geflügel etc.) kann mehrmals mit gleichen oder heterologen Transgenen infiziert werden. Durch mehrmalige Infektion mit unterschiedlicher DNA, die zum Beispiel für mehrere Enzyme eines Biosyntheseweges kodieren, können auf diese Weise ganze Enzymkaskaden in dem TGC-Wirt etabliert werden. Dadurch lässt sich auch die biochemische Expression multigener Proteine erreichen.
- e) Organ- und Zellspezifität der Infektion:
- Der weitere Weg der TGC-Amme im Organismus ist zunächst durch den natürlichen Infektionsweg bestimmt. Die TGC-Amme erreicht auf dem für sie typischen und vom jeweiligen Bakterium gesteuerten Weg das Zielorgan. Trägt die TGC-Amme im Fall von *L.monocytogenes* genetisch unveränderte Internaline, so ist das Euter unter den Zielorganen. Genetisch veränderte Internaline erlauben die Infektion anderer Organsysteme. Seinem Infektionszyklus entsprechend dringt die TGC-Amme in die Zellen ein und erscheint im Zytoplasma. Da sie genetisch defekt ist, kann die TGC-Amme sich dort nicht weiter vermehren, sie begeht

"endogenen Suizid" (siehe oben, C.1 unter Aufzählungspunkt (b)). Bei der Zellinfektion hat die TGC-Amme die wirtsfremde TGC-DNA in ihrem Gepäck in die Zelle eingeschleust. Die Übertragung der Fremd-DNA in die Zelle kann aber auch durch 5 "exogenen Suizid" (siehe oben, C.4 unter Aufzählungspunkt (b)) oder durch "Abtötung" der Bakterien durch gezielte Antibiose (siehe oben, C.3 unter Aufzählungspunkt (b)) ausgelöst werden. In diesen drei Fällen stirbt die Bakterienzelle, die die 10 Fremd-DNA in sich trägt, innerhalb der animalen Zelle und entläßt dabei die Fremd-DNA ins Zytoplasma. Schließlich kann die Übertragung der Fremd-DNA auf die animale Zelle auch durch gezielte Infektion der Zellen unter Ausbleiben der Lyse der Endosomen erreicht werden. Hierbei wird die Fremd-DNA der animalen Zelle durch Lyse der Bakterien innerhalb der 15 Endosomen zugänglich.

In jedem der angesprochenen Fälle steht die in die Zelle übertragene DNA nun als Template zur Produktion des gewünschten Fremdproteins zur Verfügung. Die Nukleinsäure kann aber auch direkt therapeutisch wirken, zum Beispiel durch Generierung einer anti-sense RNA. Die so manipulierten Zellen, Gewebe 20 oder Organe werden im Verlauf der Infektion somatisch transgen.

25 f) L.monocytogenes induzierte Proteinproduktion in der Milch von Säugetieren:

Nach Ausführen des TGC-Verfahrens - zum Beispiel mit TGC-Ammen wie L.monocytogenes aber auch anderen intrazellulär vitalen Bakterien (z.B. Yersinien), oder ins Endosom eindringenden 30 (z.B. Samonellen) oder aber mit zusätzlichen bakteriellen Faktoren aufgerüsteten, ansonsten nicht-pathogenen Bakterien (z.B. Escherichia coli oder L.innocua) - wird das Protein wird in der laktierenden Zelle gebildet und mit den anderen Produkten der Zelle in die Milch ausgeschieden. Werden mehrere 35 Tiere mit unterschiedlicher Fremd-DNA im TGC-Verfahren

somatisch transgen gemacht, so können durch Sammeln der Milch jedes einzelnen TGC-Wirtes (Melken) die unterschiedlichen Proteine voneinander getrennt produziert werden.

- 5 Aufgrund der Eigenschaften der TGC-Amme tauchen in der Milch keine L.monocytogenes (TGC-Ammen, d.h. Bakterien) auf. Sollte dies dennoch der Fall sein, so können die Bakterien mit allen dem Fachmann bekannten Methoden eliminiert werden, zum Beispiel durch Behandlung mit Antibiotika. Die Tiere (oder
10 auch der Mensch) sind nach der Durchführung des "targeted genetic conditioning" (TGC) frei von lebensfähigen, gentechnisch veränderten Organismen und unterliegen damit keinen weiteren Sicherheitsbestimmungen. Der TGC-Wirt gibt die in ihn durch das TGC-Verfahren eingetragene genetische Information
15 an die nachkommenden Zellen im Rahmen der üblichen Zellteilung weiter. Auf Abkömmlinge des TGC-Wirts wird die Information jedoch nicht übertragen, da die TGC-DNA sich nicht in der Keimbahn des TGC-Wirtes befindet. Das Umgehen (d.h. Auslassen) der genetischen Manipulation der Keimbahn des Gesamt-
20 organismus und die gezielte Proteinproduktion im vorbestimmten Organ oder Gewebe des animalen Wirts (Tier und Mensch) stellt den innovativen und neuen Aspekt des erfindungsgemäßen Verfahrens dar.

25 g) Infektionen von Geweben durch L.monocytogenes

Das Blut ist ein Gewebe, dessen erfindungsgemäße genetische Veränderung durch das TGC-Verfahren exemplarisch beschrieben wird. Die Zellen des Blutes eignen sich besonders für das TGC-Verfahren. Die Infektion von Zellen des Blutes lässt sich außerhalb des Körpers vornehmen. Die zu erzielende somatische Transgenität der Zellen kann ebenfalls außerhalb des Wirtes überprüft werden. Im Fall der attenuierten, auxotrophen Bakterien lassen sich die zum Wachstum der Zellen notwendigen Substanzen - als Beispiel für Auxotrophie dient hier die

- 16 -

Diaminopimelinsäure - dem Medium zufügen und so der Zeitraum der Lebensfähigkeit der Bakterien entsprechend dem Versuchsziel steuern. Durch anschließende Lyse der animalen Zellen kann dann überprüft werden, ob die intrazellulären Bakterien
5 noch vital sind.

Zur Reimplantation in den Empfängerorganismus werden schließlich die transfizierten Zellen verwendet, die eine genau bekannte Menge an vitalen Bakterien enthalten. Im Einzelfall
10 können dies so große Mengen an Bakterien sein, daß im Organismus weitere Organe infiziert werden. In anderen Fällen wird durch die Eliminierung vitaler Bakterien *in vitro* vor der Reimplantation in den TGC-Wirt die Transgenität gezielt auf das Gewebeblut beschränkt.

15 Die Reimplantation und damit verbunden die Disseminierung der transgenen Zellen mit oder ohne vitale Bakterien erlaubt die somatische Gentherapie von Zellen im Wirt, der in diesem Fall auch ein Mensch sein kann.

20 Das TGC-Verfahren ermöglicht es aber auch, extrakorporal Proteine zu produzieren. Dazu werden die TGC-Ammen in Eier von Geflügeltieren injiziert. Geeignete Techniken hierfür sind in der Impfstoffherstellung bei viralen Erregern bereits Stand
25 der Technik. Im Verlauf der Bebrütung der Eier werden die Zellen im Ei infiziert, somatisch transgen und produzieren dann das Fremdprotein. Aus dem Ei läßt sich nach bekannten Verfahren das Fremdprotein aufreinigen. Bei dieser Form des TGC-Verfahrens bleibt die TGC-Amme in allen Phasen der
30 Anwendung unter Laborbedingungen kontrollierbar. Die Menge des zu produzierenden Proteins hängt nur von der Injektion einer entsprechend großen Anzahl von Eiern ab.

- 17 -

h) Einsatz des TGC-Verfahrens zur somatischen Gentherapie:

Es gibt noch keine etablierte Form der somatischen Gentherapie. Derzeit wird die zur Transfektion eingesetzte
5 Nukleinsäure im Inneren von Viren oder eingepackt in Liposomen vor Einflüssen der Außenwelt geschützt.

Viren haben den Nachteil, daß sie nur eine begrenzte Aufnahmefähigkeit haben und daß bei hohen Infektionsdosen mit der
10 Entwicklung ihrer vollen zytopathischen Effekte zu rechnen ist [32a]. Sie induzieren Immunreaktionen und können so selber angegriffen und zerstört werden. Einige Viren werden durch Serum inaktiviert und werden dann für die Gentherapie unbrauchbar. Hier ist besonders die mehrfache Gabe von Viren
15 zur Gentherapie zu nennen, in deren Verlauf die Immunantwort des Wirtes angestoßen wird. Die Bildung einer gezielten gegen die Viren gerichteten Abwehr stellte sich zuletzt als ein wesentliches Problem der Verwendung von Viren im Rahmen der Gentherapie heraus.

20 Beim Einsatz von Liposomen ist die toxische Wirkung der Lipide zu berücksichtigen, die entzündliche Reaktionen auslöst.

Im Fall der in vivo Therapie gibt es noch erhebliche Defizite
25 auf dem Weg zu Anwendung der bisher benutzten Systeme des Gentransfers. Für diese Form der Therapie wird gefordert [32b]:

- 30 (i) die Resistenz des Vektors gegen Abbau nach der in vivo Gabe im Körper,
- (ii) die Gewebsspezifität, d.h. das gezielte Ansteuern des zu therapierenden Gewebes (Organs) und

(iii) die Sicherheit, womit die Unschädlichkeit der nicht zu behandelnden Organe gemeint ist [32b].

Die in dieser Patentanmeldung aufgeführten Bakterien, die hier als Vehikel zum Gentransport und Gentransfer eingesetzt werden können sollen, sind idealerweise für den Gentransfer geeignet. Die Bakterien sind auf ihren jeweiligen Wirt bestens adaptiert und können in ihm ohne äußere Eingriffe, wie Antibiotika-Therapie für eine ausreichende Zeit überleben. Sie induzieren auf definierten Infektionswegen spezifische Erkrankungen und zeigen dabei zum Teil eine ausgeprägte Organotropie. Sie können erhebliche Fremd-DNA Mengen aufnehmen (z.B. natürlich vorkommende Plasmide haben Größen von mehreren 100 Kilobasen), so daß nicht nur c-DNA's sondern sogar größere Bereiche eines Chromosoms übertragen werden können. Schließlich können sie sicher eingesetzt werden, insbesondere wenn es sich um "Krüppelbakterien" handelt, wie sie oben beschrieben worden sind. Die genetischen Defekte der TGC-Amme in Kombination mit der vorgegebenen Antibiotika-Empfindlichkeit garantieren eine effiziente Eliminierung der Bakterien, nachdem sie ihre Aufgabe, den DNA-Transfer in die eukaryonte Zelle erfüllt haben.

Beispiel:

Als Beispiele für eine somatische Gentherapie sind hier aufgeführt:

- Die Therapie der cystischen Fibrose (CF): Dazu muß der Keim dem zu therapierenden Patienten durch Inhalation verabreicht werden. Bei dem Bakterium handelt es sich vorzugsweise um einen Keim, der über Tröpfcheninfektion übertragen wird. In dem Bakterium befindet sich das CFTR-Gen, das den bei der CF maßgeblichen Defekt kurieren kann. Das Bakterium dringt in die Säulenzellen des

- 19 -

Luftweges (airway lumen-facing columnar cells) ein und transfiziert diese mit der CFTR-DNA integriert in den TGC-Vektor. Die Zellen werden somatisch transgen, der Defekt wird kuriert.

5

- Durch somatische Gentherapie mit dem humanen β -Globulins kann die β -Thalassämie behandelt werden. Dazu werden ex vivo Stammzellen der haematopoetischen Reihe mit einem TGC-Sicherheitsstamm infiziert, der das β -Globulinen auf die Stammzelle überträgt. Durch Behandlung der Zellen in der Zellkultur wird das infizierende Bakterium eliminiert und die transgene Zelle für die Rückübertragung auf den Menschen vorbereitet. Diese Übertragung erfolgt durch intravenöse Gabe.

15

- Bei der Therapie des Hurler Syndroms werden primitive CD34-positive Zellen des Knochenmarks mit dem α -L-Iduronidase-Gen transfiziert. Der Weg der Gentherapie und der Rückübertragung der Zellen auf den Patienten entspricht dem im vorherigen Abschnitt beschriebenen Weg.

20

- Bei der Gentherapie der Fanconi Anaemie wird das Gen der Fanconi Anaemie Komplementationsträgergruppe C (FACC) zur somatischen Gentherapie eingesetzt. Zielzellen der Infektion mit der TGC-Amme sind hierbei erneut CD34-positive Zellen des Knochenmarks.

i) Nachweis des Erfolges des TGC-Verfahrens

30

Der DNA-Transfer wird in der Maus bereits innerhalb der ersten 24 Stunden sichtbar, d.h. lange bevor eine spezifische Immunantwort gegen das Bakterium entstanden sein konnte. Gezeigt wurde dies durch die Produktion von β -Galactosidase oder von dem fluoreszierenden Protein EGFP in Zellkulturen

- 20 -

innerhalb von 24 Stunden. Der im Rahmen der Infektion zusätzlich auftretende "mitogene Effekt der Bakterien" begünstigt die Etablierung der DNA in der TGC-Zelle und ist damit erwünscht und für den Erfolg des TGC-Verfahrens
5 vorteilhaft.

Zusammenfassend ist deshalb festzustellen, daß der Einsatz von Bakterien zur somatischen Gentherapie sicherer ist als die Gentherapie mit viralen Systemen. Die bakterielle Infektion
10 kann gerichtet und örtlich begrenzt werden. Das Wachstum und damit die floride Infektion durch die Bakterien kann durch Ausschalten bestimmter bakterieller Faktoren verhindert werden. Außerdem kann das Wachstum der Bakterien in der eukaryonten Zelle genau beeinflußt und generell verhindert
15 werden. Schließlich ist die Beendigung der bakteriellen Infektion durch den Einsatz von Antibiotika jederzeit möglich, d.h. die Infektion läßt sich örtlich, zeitlich und effektiv begrenzen.

20 Im folgenden wird am Beispiel von L.monocytogenes die Erfindung detailliert beschrieben:

Beispiel 1: Die Herstellung von TGC-Sicherheitsstämmen

25 Die L.monocytogenes Sicherheitsstämme werden durch gezielte genetische Veränderungen von primär pathogenen L.monocytogenes Stämmen hergestellt. Dabei werden mehrere Ebenen der Sicherheit parallel zueinander etabliert. Damit wird verhindert, daß durch Rückmutationen die Vitalität oder Pathogenität
30 wieder entstehen können. Die Mutationen betreffen Gene, die (1) das Überleben der Bakterien in der Zelle beeinflussen, (2) die die Pathogenität der Bakterien im TGC-Wirt mindern und (3) die das Überleben der Bakterien in der Umwelt nach einer möglichen Ausscheidung verhindern.

- 21 -

- a) Erste Ebene der Sicherheit - Sicherheitsrelevante Eigenschaft: Überleben in der Umwelt (siehe oben, B.1 unter Aufzählungspunkt (b))
- 5 Die TGC-Ammen können dem TGC-Wirt entweder durch Injektion oder durch perorale Gabe appliziert werden. Bei peroraler Gabe kann es zu einem Überangebot an Bakterien und dadurch zur Ausscheidung von Bakterien kommen, die vom Organismus nicht aufgenommen werden. Damit diese ausgeschiedenen Bakterien
10 keine Chance haben, in der Umwelt zu überleben, können die TGC-Sicherheitsstämme zusätzliche Mutationen enthalten, die das Wachstum der Bakterien in der Umwelt verhindern.
- Als ein Beispiel hierfür wird das Ausschalten des cspL-Gens (cold shock protein der Listerien) angeführt. Das hat zur Folge, daß die Bakterien bei Temperaturen unter 20°C nicht mehr wachsen können. Das Wachstum und die Infektionsfähigkeit bei 37°C sind nicht beeinträchtigt, werden allerdings bei gleichzeitigen Mutationen gemäß a) und b) zusätzlich moduliert. Das cspL-Gen, das in den erfindungsgemäß eingesetzten Sicherheitsstämmen deletiert ist, ist im Sequenzprotokoll als SEQ. ID No. 2 dargestellt. Ein entsprechender cspL-deletierter Stamm ist unter der Bezeichnung L.monocytogenes EGD Delta cspL1 bei der DSM unter der Nr. 11883 hinterlegt worden.
25
- Die erfindungsgemäß eingesetzten TGC-Sicherheitsstämme können nur auf speziellen Wachsstumsmedien angezüchtet werden. Die Wachstumstemperatur muß dabei über 37°C betragen, unter 20°C ist ein Wachstum unmöglich. Die Bakterien besitzen eine eingeschränkte Pathogenität und vermögen nur noch in begrenzte, eng umschriebene Areale des TGC-Wirtes vorzudringen. Damit wird die Sicherheit des Systems für Mensch und Umwelt
30 garantiert. Die TGC-Amnen sind außerhalb der artfiziellen Medien, hier speziell in der Wirtszelle, nicht mehr wachstumsfähig. Diese eingeschränkte intrazelluläre Lebensfähigkeit ist
35

- 22 -

gleichzeitig eine Voraussetzung für die Freisetzung der TGC-DNA in der Wirtszelle und damit für die Induktion der somatischen Transgenität im TGC-Verfahren.

- 5 b) Zweite Ebene der Sicherheit - Attenuierung: verminderte Pathogenität (siehe oben, B.2 unter Aufzählungspunkt (b))

10 Die zweite Ebene der Attenuierung der TGC-Sicherheitsstämme umfaßt Mutationen in den Pathogenitätsfaktoren. Durch gezielte Mutationen in definierten Faktoren wird die Pathogenität der Bakterien abgeschwächt, die Apoptoseinduktion der infizierten Wirtszelle verhindert und gleichzeitig die Immunreaktion in eine gewünschte Richtung dirigiert. Die Mutationen schränken 15 die intrazelluläre Motilität der Bakterien und damit ihre Ausbreitung in sekundäre Zellen ein. Dadurch wird die Infektion unter Beibehaltung der Behandelbarkeit durch bekannte Antibiotika auf die ausgesuchten Zielzellen begrenzt.

20 Aus Sicherheitserwägungen ist es wünschenswert, die intrazelluläre Ausbreitung der TGC-Amme nach der Infektion einzuschränken oder gar zu verhindern. Das genaue Wissen über die intrazelluläre Lebensweise und die Motilität der oben-25 genannten Bakterien ermöglicht es, definierte, stabile Mutanten mit verminderter Fähigkeit zur Infektion des TGC-Wirtes zu erzeugen.

Bei *L.monozytogenes* betreffen die in diesem Sinne attenuierten Mutationen zum Beispiel das hly-Gen mit der Folge der Blockade 30 der Infektion der ersten Zelle. Als ein Beispiel für die Ausschaltung dieses Pathogenitätsfaktors ist der Stamm *L.monozytogenes* EGD Hly_{D491A} hinterlegt worden und hat die Hinterlegungsnummer DSM 11881 erhalten.

Ein anderes Beispiel für die Verminderung der Pathogenität von L.monocytogenes sind Mutationen im actA-Gen oder die Deletion von Regionen, die für die Interaktion zwischen actA und dem Wirtszellprotein VASP erforderlich sind, mit der Folge, daß 5 die intrazelluläre Motilität blockiert ist. Schließlich gibt es auch Mutationen des plcB-Gen, wodurch den Bakterien die Möglichkeit genommen wird, sich in eine zweite Zelle hinein auszubreiten. Der hinterlegte Stamm L. monocytogenes EGD Delta actA Delta plcB ist ein Beispiel für eine doppelte Mutation, 10 in der sowohl das actA-Gen als auch das plcB-Gen ausgeschaltet sind. Er trägt die Hinterlegungsnummer DSM 11882.

Außerdem ist es auch möglich, in L.monocytogenes das Wildtyp-Listeriolysin-Gen gegen ein mutiertes Allel auszutauschen. 15 Dann werden die Eigenschaften des Listeriolysin, sowohl eine Apoptose in verschiedenen Wirtszellen zu induzieren als auch und eine starke T-Zellvermittelte Immunantwort zu generieren, eingeschränkt.

20 c) Überleben in der Zelle: - Endogener Suizid: 3. Ebene der Sicherheit (siehe oben, C.1 unter Aufzählungspunkt (b))

Allgemein zeichnen sich die für das TGC-Verfahren attenuierten 25 Bakterien durch definierte Deletionen in den Genen aus, die für die Biosynthese integraler bakterieller Komponenten essentiell sind. Die ausgewählten auxotrophen Bakterien eignen sich als TGC-Amme, denn als attenuierte Bakterien können sie fremde DNA in die Zelle transportieren. Da die Bakterien jedoch in den Zellen von essentiellen "Wachstumsfaktoren" 30 abgeschnitten sind, lysieren sie sponaten und setzen dabei die TGC-DNA in der Zelle frei.

Als TGC-Sicherheitsstämme werden L.monocytogenes eingesetzt, die genetisch derart verändert sind, daß sie die Zelle zwar 35 noch infizieren, sich aber in der Zelle nicht mehr vermehren

können. Dies wird u.a. durch die Inaktivierung des dapE-Gens in *L.monocytogenes* erreicht. Listerien sind Gram-positive Bakterien, die ebenso wie die Gram-negative Bakterien zur Vernetzung der Zellwand meso-Diaminopimelinsäurederivate (DAP) benötigen. Die Biosynthese von Diaminopimelinsäure ist daher für die Bildung der bakteriellen Zellwand essentiell. DAP-auxotrophe Bakterien unterliegen der spontanen Lyse, wenn diese Aminosäure im Kuluturmedium nicht mehr angeboten wird. Die Enzyme, die bei der DAP-Synthese im Bakterium beteiligt sind, sind in Säugerzellen nicht vorhanden. In TGC-Sicherheitsbakterien sind eben diese Enzyme deletiert oder durch Insertionen oder auf eine andere Weise inaktiviert. Das dapE von *L.monocytogenes*, das in den erfindungsgemäß eingesetzten Sicherheitsstämmen inaktiviert wurde, ist im Sequenzprotokoll als SEQ. ID No. 1 dargestellt. Zur genetischen Manipulation des dapE Gens in *L.monocytogenes* mußte dessen Sequenz bestimmt werden, den entsprechende Gene z.B. aus *E.coli* weisen lediglich eine ca 30%ige Homologie zur Sequenz des SEQ ID No. 1 Protokoll auf.

20

Die dieses oder anderer Gene des DAP-Biosyntheteweges beraubten Bakterien, sog. DAP-Mutanten, können weder innerhalb noch außerhalb des Wirtes wachsen. Dazu benötigen sie den Zusatz von großen Mengen an DAP (1mM) zum Wachstumsmedium. Fehlt es an DAP, kann das Bakterium weder im TGC-Wirt noch außerhalb des TGC-Wirts überleben. Damit bieten diese DAP-Mutanten sowohl Sicherheit vor einer bakteriellen Infektion des TGC-Wirtes als auch Sicherheit vor einer Infektion anderer Organismen im Falle der Freisetzung eines derartigen Stammes in die Außenwelt.

30
35 Ein Eingriff ins Genom von Salmonellen mit entspechnder Auswirkung (Schaffung einer auxotrophen Mutante) stellt die Deletion (oder Blockade oder Mutagenese) des aroA Gens dar, das zur Synthese aromatischer Aminosäuren essentiell ist. Aus

- 25 -

dem Salmonellen Impfstamm (zugänglich bei der amerikanischen Stammsammlung unter ATCC14028) lässt sich durch genetische Manipulation mit Techniken, die dem Fachmann bekannt sind, und in Kenntnis des aroA Gens (Genebank Annahme-Nummer M 5 10947) eine Mutante gewinnen, die analog den hier für Listerien beschriebenen rekombinanten Bakterien als TGC-Sicherheitsstamm fungieren kann. Die Freisetzung der Fremd-DNA erfolgt, wie für den oben beschriebenen *L.monocytogenes* delta dapE Stamm, durch Absterben der Bakterien nach Aufnahme in die 10 Zelle. Anderes als *L.monocytogenes* vermögen Salmonellen nicht in das Zytoplasma der Zelle zu gelangen. Die Freisetzung der Fremd-DNA erfolgt in diesem Fall aus den Endosomen ins Zellinnere.

15 Es sind auch noch andere attenuierte Mutationen von *L.monocytogenes* bekannt, in denen die Biosynthese von Nukleinsäuren, Aminosäuren, Zuckern oder anderen Zellwandbausteinen blockiert ist [33 bis 35]. Gleiches kann auch durch Mutationen in regulatorischen Genen erreicht werden, die für den intrazellulären Lebensstil der Bakterien essentiell sind. Beispieldhaft für ein derartiges Gen ist phoP von *Salmonella typhimurium* [36].

25 Die hier aufgeführten Beispiele für *L.monocytogenes* sind auf andere intrazellulär vitale Bakterien oder Bakterien übertragbar, die erst durch Aufrüstung mit Pathogenitätsfaktoren zu intrazellulären Erregern gemacht werden. Dies gilt insbesondere für Bakterien der Gattungen *Aeromonas*, *Bartonella*, *Brucella*, *Campylobacter*, *Clostridia*, *Enterobacteriaceae* 30 (besonders *E.coli*, Salmonellen, Shigellen, Yersinien), *Mycobacterium*, *Renibacterium* und *Rhodococcus*. Ein in diesem Sinn aufgerüsteter TGC-Sicherheitsstamm ist zum Beispiel *Bacillus subtilis*, der zusätzlich mit dem Listeriolysin aus *L.monocytogenes* ausgerüstet ist.

Eine wichtige Voraussetzung für die Übertragung von DNA selbst in "abgelegene" Körperzellen ist der Schutz der DNA auf dem Weg bis zur Zielzelle oder dem Zielgewebe oder dem Zielorgan. Die Fähigkeit intrazellulär vitaler Bakterien wie L.monocytogenes zur intrazellulären Ausbreitung ist eine ideale Eigenschaft, Gene in abgelegene Zellen, in tiefere Gewebe und Organe zu transportieren. Nach erfolgreichem Transfer der TGC-DNA in die Zielzelle verstirbt der Bote, die TGC-Amme, in Folge der Attenuierung (B.1), der Induktion von Auxotropien (B.2), des endogenen Suizids (C.1), der Infektion über Endosomen (C.2), der Infektion über Phagolysosomen (C.3), des exogenen Suizids (C.4) oder der Antibiotikatherapie (D.1).

Beispiel 2: Freisetzung der Fremd-DNA in der animalen
15 Zelle (synonym: Gewebe; Organ)

a) Infektion über Endosomen: Transfer des Expressionsplasmids ohne Befreiung der Bakterien aus dem Endosomvesikel (siehe oben, C.2 unter Aufzählungspunkt (b))

20 Es wurde getestet, ob Bakterien in der Lage sind, ihre Plasmid-DNA ins Zytoplasma infizierter Wirtszellen zu übertragen, ohne daß sie sich vorher aus dem Endosomvesikel befreit haben müssen. Dazu wurde die Fähigkeit der L. monocytogenes Dhly Mutante, die nicht mehr aus dem Endosom austreten kann, untersucht, als übertragendes Bakterium für den DNA-Transfer zu fungieren. Als zu übertragende Fremd-DNA wurde EGFP gewählt, ein fluoreszierendes Protein, das unter der Kontrolle eines CMV-Promotors kloniert war. Als Maß für die erfolgreiche Übertragung der Fremd-DNA - d.h. als Maß für die Transfektion der eukaryonten Zelle - wurden 10.000 Zellen im FACS-Scanner nach Infektion mit den jeweiligen L.monocytogenes Stämmen auf das Vorkommen der EGFP-ausgelösten Fluoreszenz untersucht. Die Anzahl ist in Tabelle 1 in % der Gesamtzahl der gemessenen eukaryonten Zellen ausgedrückt. Bei

den Experimenten diente der L. monocytogenes Wildtyp-Stamm EGD als positiv Kontrolle. Geprüft wurde auch eine isogener, nicht invasiver Δ InlAB Stamm. Die Aussagen, die mit diesen Bakterien gewonnen wurden, haben Allgemeingültigkeit und sind 5 auf andere Bakterien übertragbar.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefaßt und zeigen, daß die Dhly Mutante in Bezug auf den DNA-Transfer vom Bakterium in die eukaryonte Zelle genauso effizient ist, wie 10 der L. monocytogenes Wildtyp-Stamm. Der L. monocytogenes DInlAB Stamm ist als Vehikel für DNA-Transfer in die hier angegebenen Zellen nicht (PtK2) oder aber wesentlich schlechter (Hep-2) geeignet. Die Experimente zeigen weiterhin, daß die aktive Aufnahme der Bakterien durch die eukaryonte Zelle (in diesem 15 Fall keine professionellen Phagozyten) die Voraussetzung für die Transfektion der Zellen ist. Die Anheftung der Bakterien wird durch die Interaktion zwischen bakteriellen Internalinen (InlA und/oder InlB) und den Rezeptoren der animalen Zellen bewirkt. Die Experimente des folgenden Beispiels zeigen, daß 20 Internaline zur Aufnahme von Bakterien in professionelle Phagozyten nicht notwendig sind.

Zell-linie	Ursprung	L.monocytogenes-Stamm	Transfizierte Zellen in %
25	PtK2 Kangaroo rat kidney	Wildtyp EGD	1.71
		Δ hly	1.78
		Δ inlAB	0
	Hep-2 human larynx carcinoma	Wildtyp EGD	4.58
		Δ hly	4.31
		Δ inlAB	0.24

b) Infektion über Phagolysosomen: Aufrüstung nicht pathogener Stämme zum TGC-Sicherheitsstamm:(siehe oben, C.3 unter 30 Aufzählungspunkt (b))

Das im folgenden für *L. innocua* dargestellte Beispiel ist exemplarisch und kann auf andere nicht pathogene Bakterien (z.B. *Escherichia coli*) übertragen werden. Die auszuführenden Eingriffe in die genetische Ausstattung solcher Bakterien 5 entsprechen den hier für *L. innocua* angeführten.

Ein nicht pathogener *L. innocua* Stamm (Serovar 6a) wurde mit dem Pathogenitätsfaktoren Listeriolysin und ActA aus *Listeria monocytogenes* "aufgerüstet". Um die Expression dieser Gene regulieren zu können, wurde als drittes Gen der in trans positiv-wirkende Transkriptionsfaktor (PrfA) in den gentechnisch manipulierten *L. innocua* Stamm einkloniert. Die Gegenwart von PrfA macht die Expression der Virulengene von der Wachstumstemperatur abhängig. Da dieser rekombinante 10 *L. innocua* Stamm keine Internaline besitzt, d.h. von sich aus nicht invasiv ist, kann er nicht in die oben erwähnten Zellen (Ptk2; Hep-2) eindringen. Wünscht der Experimentator zusätzlich auch solche Zelle infizieren zu können, so müssen die Bakterien zusätzlich mit den Internalinen InlA und/oder InlB 15 ausgestattet werden. Die Experimente des vorliegenden Beispiels zeigen, daß es zur Aufnahme des *L. innocua* (hly+; actA+) Stammes durch professionelle Phagozyten dieser bakteriellen Produkte (Internaline) nicht bedarf. Nach ihrer Phagozytose setzt der *L. innocua* Stamm (hly+; actA+) das Eiweiß 20 Listeriolysin zur Lyse der Phagolysosomen der professionellen Phagozyten ein. Im elektronenmikroskopischen Bild ist zu erkennen, daß der genetisch manipulierte *L. innocua* (hly+; actA+) Stamm im Zytoskelett der professionellen Phagozyten auftaucht. Der Wildtypstamm *L. innocua* Serovar 6a hingegen wird 25 im Phagolysosom abgetötet und erscheint nicht im Zellzytoskelett. Die Expression des ActA-Proteins erlaubt dem *L. innocua* (hly+; actA+) Stamm eine Aktin-Zytoskelett abhängige intrazelluläre Bewegungen, die im EM-Bild der Bewegung der *L. monocytogenes* Stämme ähnlich sieht. Auf Grund des Fehlens 30 weiterer Gene, wie z.B. des plcB Gens, kann sich der hier 35

erwähnte L.innocua (hly+; actA+) Stamm nicht auf Nachbarzellen ausbreiten. Diese spezifische Änderung in der Infektiosität wurde bereits für rekombinante L.monocytogenes Δ plcB Stämme beschrieben.

5

Die gezielte Auswahl von Genen, hier hly und actA, und deren Transformation in nicht pathogene Bakterien, überträgt die ausgewählten L.monocytogenes Eigenschaften auf nicht pathogene Bakterien. Die Befreiung der Bakterien aus dem "tödlichen" Phagolysosom ist die Voraussetzung für den Transfer fremder DNA in die infizierten Zellen. Die zur Umprogrammierung der animalen Zelle zu übertragende DNA wird dabei in Konstrukte integriert, wie sie oben bereits für attenuierte L.monocytogenes Bakterien - die bereits als solche erfindungsgemäß eingesetzt werden können - beschrieben wurden. Die Freisetzung der genetischen Information erfolgt erfindungsgemäß durch (i) Schaffung auxogener Mutanten (Deletion endogener, lebensnotwendiger Gene), durch (ii) Einführung von "Suicid-Genen", (iii) durch induzierte Aufnahme in Endosomen und Abtötung darin oder (iv) durch eine zeitlich definierte und auf die Abtötung der Bakterien in einem Zielorgan oder Gewebe bezogene Antibiotikatherapie.

Die Experimente dieses Beispiels zeigen exemplarisch, wie von Hause aus nicht pathogene Bakterien sukzessiv "aufgerüstet" werden können. Durch Ausrüstung mit definierten bakteriellen Faktoren (hier Gen d.h. Eigenschaften natürlich invasiver Bakterien) lassen sich ansonsten für das TGC-Verfahren primär ungeeignete Bakterien, von Experimentator derart manipulieren und steuern, daß sie für eine kontrollierte Infektion und Übertragung von DNA in die animale Zelle (synonym: Gewebe, Organ, Ganztier, Mensch) eingesetzt werden können.

c) Freisetzung durch exogenen Suizid: Einklonierung von Suizidgenen: (siehe oben, C.4 unter Aufzählungspunkt (b))

- 30 -

Suizid-Gene, die nach dem Eindringen in die Wirtszelle aktiviert werden und zum Absterben der Bakterien führen, können den Bakterien in Form von Lysisgenen aus Bakteriophagen, zum Beispiel mit dem S-Gen des Bakteriophagen Lambda oder Analoga [37], oder mit Killergenen aus Plasmiden [38] zugeführt werden. Diese Gene stehen unter der Kontrolle eines intrazellulär induzierbaren Promotors (zum Beispiel pagC-Promotor aus *Salmonella* [38]).

- 10 d) Freisetzung durch Antibiotikatherapie: Gezielte Freisetzung von Fremd-DNA in der Lunge nach Tröpfchen-Infektion von *Listeria monocytogenes* (siehe oben, D.1 unter Aufzählungspunkt (b))
- 15 Die Infektion mit den Bakterien erfolgte nach dem Verfahren der "Body plethysmography in spontaneously breathing mice" gemäß R. Vijayaraghavan [Arch. Toxicol. 67: 478-490 (1993)]. Bei dem Versuch wurden die Mäuse einzeln in einer Inhalationskammer für eine halbe Stunde einem Aerosol von einem Milliliter Bakteriensuspension ausgesetzt, das insgesamt 5000 Bakterien enthielt. Diese Anzahl von Bakterien entspricht einer LD50 Dosis bei intraperitonealer Gabe der Bakterien. Um den Verlauf der Infektion in Echtzeit verfolgen zu können, wurden die Bakterien erneut mit einem EGFP-Genkonstrukt 20 transformiert. Durch Fluoreszenzanalyse des im Gewebe gebildeten EGFP-Proteins wurde der Weg der Bakterien im Tiermodell verfolgt. Demnach dringen die Bakterien innerhalb einer halben Stunde in die Säulen- und Endothel-Zellen des Luftweges ein. Zu diesem Zeitpunkt sind keine Bakterien in anderem Gewebe bzw. Organen des infizierten Tiers, wie z.B. Milz, Leber, Gehirn, zu finden. Die Infektion bleibt für bis 25 zu 18 Stunden ausschließlich auf die Lunge begrenzt. Erst nach 24h werden auch andere Organen befallen.

Der Versuch zeigt, daß die Ausbreitung der Bakterien nach Tröpfcheninfektion auf das Primärorgan begrenzt werden kann, wenn in deren Lebensfähigkeit eingegriffen wird. Zwei Wege, dies zu erreichen, sind die Verwendung attenuierter Mutanten

5 (z.B. deletiert im "Ausbreitungsgen" ActA) und/oder die Zerstörung der Bakterien durch Antibiotika-Therapie Zugabe zu einem vom Experimentator vorgegebenen Zeitpunkt, d.h. in einem vom Experimentator vorgegebenen Organ.

10 **Beispiel 3: Beschreibung der TGC-Vektoren**

TGC-Vektoren sind episomale DNA, zum Beispiel Plasmide mit geringer Aufnahmefähigkeit von Fremd-DNA (pMB-Abkömmlinge, die für einzelne Gene ausreicht), oder mit größerer DNA-Aufnahmefähigkeit (wie bei P1- oder F-Plasmiden), um die somatische Transgenität für komplexe Biosynthese-Wege zu schaffen.

In allen Fällen handelt es sich um Plasmide, die in den zur genetischen Veränderung und zur Anzucht für das TGC-Verfahren eingesetzten Bakterien Wirten repliziert werden. Als Beispiel für einen Zwischenwirt, in dem genetische Bausteine konstruiert werden können, eignen sich E.coli oder andere in der rekombinanten DNA-Technologie üblicherweise eingesetzte Bakterien. Als TGC-Sicherheitsstamm eignet sich unter anderem L.monocytogenes oder die anderen obengenannten Bakterien, die als TGC-Amme fungieren. Um diese Bedingung zu erfüllen, enthalten die Plasmide die wirtsspezifischen Plasmid-Replikon-Sequenzen. Bei der Erzeugung der rekombinanten DNA müssen transformierte von "nackten" Wirtszellen unterschieden werden.

20 Als Selektionsprinzipien können dabei die gängigen Antibiotikaresistenzgene eingesetzt werden.

- 32 -

Beispiel 4: Transformation von L.monocytogenes-Sicherheitsstämmen zu TGC-Ammen

Die Transformation von L.monocytogenes erfolgt nach einem
5 modifizierten Protokoll von Park und Stewart [40].

Dazu werden Bakterien bis zu einer optischen Dichte von $OD_{600} = 0,2$ angezogen. Dem Anzuchtsmedium wird Ampicillin ($10\mu g/ml$) und 1 mM Glyzin zugegeben. Es erfolgt dann eine weitere
10 Vermehrung bis zu einer OD_{600} von 0,8 bis 1,0. Die Zellen werden durch Abzentrifugation geerntet und in 1/250 Vol. kaltem Elektroporationspuffer (1 mM Hepes, pH 7,10; 0,5 M Sucrose) aufgenommen. Als Vorbereitung zur Elektroporation werden die Bakterien bis zu viermal gewaschen.

15 Zur Elektroporation werden $50 \mu l$ der vorbereiteten Zellen in eine Elektroporationsküvette gegeben, die Elektroporation erfolgt bei 10 kV/cm, 400 Ohm, 25 μF unter Einsatz von ca $1 \mu g$ DNA.

20 Danach kommen die Zellen sofort auf Eis und werden in 10-fachem BHI-Medium aufgenommen und für 2 Stunden bei 37°C unter vorsichtigem Schütteln bebrütet. Nach dieser Zeit werden die Zellen ausplattiert und bei der gewünschten Temperatur
25 bebrütet. Die Effizienz der Transformation nach dieser Methode beträgt 10^4 bis 10^5 Transformaten pro μg eingesetzter Plasmid DNA.

Beispiel 5: Beschreibung der Anzucht von TGC-Ammen zum Einsatz im TGC-Verfahren

30 Listerien wurden bevorzugt in der Brain-Heart-Infusion Broth zum Beispiel BHI der Firma Difco angezüchtet. Alternativ und für spezielle Anwendungen (radioaktive Markierung listerieller Proteine) können die Bakterien in Tryptic Soy broth (TSB) oder

- 33 -

in Listerien Minimal Medium (LMM) gezüchtet werden [36]. Die Bakterien werden abzentrifugiert und mehrfach im geeigneten Transfer-Medium, zum Beispiel einem Bicarbonat-haltigen Puffer, gewaschen.

5

Derart vorbereitete Bakterien können unter Zusatz von 15% Glycerin Lösung bei -80°C für mindestens 6 Monate aufbewahrt werden, bevor sie in das TGC-Verfahren eingesetzt werden.

10 **Beispiel 6: TGC-Verfahren – Verfüttern der TGC-Ammen**

Zur Einleitung des TGC-Verfahrens wird den Tieren für einige Stunden das Trinkwasser entzogen. Die (TGC-Ammen: TGC-DNA im gewünschten TGC-Stamm) werden in einem Bicarbonat-haltigen Puffer geeigneter Konzentration aufgenommen und den Tieren oral, durch Inhalation oder per Injektion (parenteral, intramuskulär, intraperitoneal oder direkt in das gewünschte Zielorgan) verabreicht. Die Art der Applikation richtete sich nach dem physiologischen Infektionsweg der entsprechenden TGC-Amme. Die Auswahl des Keimes der als TGC-Sicherheitsstamm eingesetzt wird, richtet sich nach Zielorgan und wird entsprechend des Infektionsweges und entsprechend des Organotropismus des jeweiligen Bakteriums festgesetzt. Die Dosis an Bakterien wird so gewählt, daß die gewünschte organotrope Einschleusung der TGC-Amme erzielt wird. Die Menge und die Art der Applikation der Bakterien richtet sich dabei nach dem jeweiligen Bakterium, ist aber auch vom Wirt und dem Zielorgan abhängig (siehe auch Beispiel 2).

30 **Beispiel 7: Durchführung der somatischen Gentherapie**

Als Beispiele für eine somatische Gentherapie sind hier aufgeführt:

- Die Therapie der cystischen Fibrose (CF): Dazu muß der Keim dem zu therapiierenden Patienten durch Inhalation verabreicht werden. Bei dem Bakterium handelt es sich vorzugsweise um einen Keim, der über Tröpfcheninfektion übertragen wird. In dem Bakterium befindet sich das CFTR-Gen, das den bei der CF maßgeblichen Defekt kurieren kann. Das Bakterium dringt in die Säulenzellen des Luftweges (airway lumen-facing columnar cells) ein und transfiziert diese mit der CFTR-DNA integriert in den TGC-Vektor. Die Zellen werden somatisch transgen, der Defekt wird kuriert.
5
- Durch somatische Gentherapie mit dem humanen β -Globulingen kann die β -Thalasaemie behandelt werden. Dazu werden ex vivo Stammzellen der haematopoetischen Reihe mit einem TGC-Sicherheitsstamm infiziert, der das β -Globulinen auf die Stammzelle überträgt. Durch Behandlung der Zellen in der Zellkultur wird das infizierende Bakterium eliminiert und die transgene Zelle für
10
- Bei der Therapie des Hurler Syndroms werden primitive CD34-positive Zellen des Knochenmarks mit dem α -L-Iduronidase-Gen transfiziert. Der Weg der Gentherapie und der Rückübertragung der Zellen auf den Patienten entspricht dem im vorherigen Punkt.
15
- Bei der Gentherapie der Fanconi Anaemie wird das Gen der Fanconi Anaemie Komplementationsgruppe C (FACC) zur somatischen Gentherapie eingesetzt. Zielzellen der Infektion mit der TGC-Amme sind hierbei erneut CD34-positive Zellen des Knochenmarks.
20
-
-
-
-

Beispiel 8: Kontrolle für den Erfolg der induzierten somatischen Transgenität

Nach dem Transfer der TGC-DNA in den TGC-Wirt ist der Erfolg des TGC-Verfahrens nachzuweisen. Dazu eignen sich immunologische Nachweise des Genproduktes (Proteins) durch Immunoassays wie den ELISA, den Immunoblot oder andere bekannte Nachweise, die auf einer Antigen-Antikörperreaktion beruhen. T-Zell-Antworten können in speziellen Assays abgerufen werden und werden immer dann angewendet, wenn es sich bei dem Antigen um eine Substanz handelt, die über MHC-Klasse I vermittelte Immunantworten erkannt wird.

Handelt es sich bei dem produzierten Protein um ein Enzym, so kann dessen biologische Aktivität in Form der enzymatischen Aktivitätstestung erfolgen. Besitzt das Protein zusätzlich eine biologische Aktivität, so wird die Leistungsfähigkeit des gebildeten Proteins durch biologische Assays abgerufen.

Für Proteine, die eine passive oder aktive Immunisierung des TGC-Wirtes induzieren, wird die Protektion gegenüber dem auslösenden Agens getestet. Es kann sich zum Beispiel um die Verhinderung der Besiedlung, der Infektion (oder der apparenten Erkrankung) des Versuchstieres nach Belastung mit dem pathogenen Organismus (Bakterium oder Virus) handeln.

Beispiel 9: Ernte des Proteins

Die Gewinnung des produzierten Proteins erfolgt durch Techniken, die jeder in der Landwirtschaft tätigen Person bekannt sind:

- ist der TGC-Wirt eine Kuh oder ein anderes laktierendes Nutztier und das Euter das infizierte Organ, so werden die bekannten Techniken des Melkens eingesetzt;

- wenn Geflügeltiere wie Hühner als TGC-Wirt eingesetzt wurden, so werden die Eier gesammelt und der Protein-Reinigung zugeführt;
- 5 - die Aufarbeitung von Proteinen aus Organen, deren Produkte nicht nach außen abgegeben werden, erfolgt durch die Gewinnung des entsprechenden Organs, wozu in der Regel eine Schlachtung nötig sein wird, zum Beispiel bei Fischen;
- 10 - ist das Blut das somatisch transgene Gewebe, so wird das gewünschte Produkt nach Venenpunktion aus dem Blut oder seinen Zellen gewonnen und mit dem Fachmann bekannten Methoden aufgereinigt.

15

Beispiel 10: Anreinigung des Proteins

Eine Vorreinigung des zu produzierenden Proteins erfolgt durch Trennungsverfahren, die sich primär physikalischer oder physikochemischer, dem Fachmann wohl bekannter Methoden bedienen. Dazu gehören Fällungen der Proteine mit Salzen (zum Beispiel Ammoniumsulfat), mit Säuren (zum Beispiel Trichlorestigsäure) oder unter Einwirkung von Hitze oder Kälte.

25 Eine grobe Trennung wird auch mittels der Säulenchromatographie erreicht. Alle hier eingesetzten Verfahren richten sich sehr stark nach den primären Medien, in denen sich das jeweilige Protein anreichert. So sind zum Beispiel für die Aufarbeitung von Milch oder Eiern in der Industrie viele 30 Methoden bekannt, die auch auf die hier geschilderte Erfindung anwendbar sind. Gleiches gilt für die Aufarbeitung von Blut als somatisch-transgenes Gewebe. Hier kann auf die Erfahrungen auf die Transfusionsmedizin, spezielle auf die Aufarbeitung und Reinigung von Blutgerinnungsfaktoren zurückgegriffen 35 werden.

Beispiel 11: Reinigung des Proteins

Zur endgültigen Reinigung der Proteine sind alle Methoden einsetzbar, die für konventionelle Reinigungen von Proteinen

5 Anwendung finden. Dazu gehören

- die Reinigung mittels Affinitätschromatographie zum Beispiel unter Ausnutzung der Rezeptor-Ligand Interaktion;

10

- die Darstellung von Fusionsproteinen mit sog. "Tags", die zur spezifischen Interaktion mit einer Matrix der Chromatographie eingesetzt werden können (zum Beispiel Poly-Histidin-Tag und Nickel-Säulen-Chromatographie; die 15 Streptavidin-Biotin Technologie der Affinitätsreinigung). Die Tags können bei fachgerechter Einführung einer entsprechenden Proteaseschnittstelle durch späteren Proteasen-Verdau wieder entfernt werden;

20

- die Reinigung mittels spezifischer Antikörper (Immunaffinitätschromatographie);

- die Ausnutzung natürlicher Affinitäten zwischen dem Zielprotein und anderen Proteinen, Kohlehydraten oder anderen Bindungspartnern wie im Fall des Toxin A von Clostridium difficile, dessen Bindungsfähigkeit an Thyroglobulin bei 4°C und dessen anschließender Elution durch Temperaturerhöhung auf 37°C.

25

Beispiel 12: Produktion von TGC-Proteinen:

Die Liste der durch das TGC-Verfahren herstellbaren Proteine ist theoretisch unbegrenzt und umfaßt vor allem den Bereich der Hormone, Regulationsfaktoren, Enzyme, Enzyminhibitoren,

35

humane monoklonale Antikörper sowie die Herstellung von

Oberflächenproteinen pathogener Mikroorganismen oder viraler Hüllproteine zur ungefährlichen Herstellung diagnostischer Tests und verträglicher Impfstoffe. Es handelt sich dabei sowohl um Massenartikel wie humanes Serumalbumin als auch um 5 Proteine, die in geringen Mengen eingesetzt werden wie Hirudin, Blutgerinnungsfaktoren, Antigene zur Tumorprophylaxe und zur aktiven Immunisierung (zum Beispiel Papilloma-Antigen) sowie um Antikörper zur passiven Immunisierung.

Literaturverzeichnis:

- 5 1. Cossart P. und B.B. Finlay "Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens Science 276: 718-725.
- 10 2. Falkow, S., Isberg, R.R. und Portnoy D.A. (1992) The interaction of bacteria with mammalian cells Ann. Rev. Cell Biol. 8:333-63.
- 15 3. Weinberg, A.N. Zoonoses S. 291-2795; In Principle and Practice of Infectious Diseases, Eds. Mandell, Douglas und Bennett, J.E. und Dolin R. Churchill Linvingstone New York, 1995.
- 20 4. Farber J.M. und Peterkin, P.J. (1991) Listeria monocytogenes - a foodborne pathogen Microbiol. Rev. 55: 476-511.
5. Thoen C.O. (1994) Tuberculosis in wild and domestic animals pp. 157-62, in Tuberculosis: Pathogenesis, Protection and Control ; ASM, Washington DC 20005.
- 25 6. von Hase, U., Pulz, M., Windorfer, A: EHEC in Niedersachsen, Januar 1995 - August 1997. Niedersächs. Ärtzebl (1997) 20-23 u 38-40.
- 30 7. Swaminathan B., Rocourt J., und Bille J.. (1995) Listeria. In: Manual of Clinical Microbiology. Eds: Murray, P.R., Baron E.J., Pfaffer M.A., Tenover F.C., und Yolken R.H. S.341-348. ASM-Press Washington DC.
- 35 8. Hof, H., Nichterlein, T. und Kretschmar, M. (1997) Management of Listeriosis. Clin. Microbiol. Rev. 10: 345-357.

- 40 -

8a. Simon, C. und Stille, W. Antibiotikatherapie, Schattauerverlag,

9. Chakraborty, T. und Wehland, J (1997) The host cell
5 infected with Listeria monocytogenes pp. 271-290; in Host
response to intracellular pathogens, Ed. S.H.E. Kaufmann R.G.
Landes co., Austin, USA.

10. Gaillard, J.L., Berche, P., Frehel, C., Gouin, E. und
Cossart, P. (1991) Entry of L. monocytogenes is mediated by
internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens
from gram-positive cocci Cell: 65; 1127-1141.

11. Lingnau, A., Domann, E., Hudel, M., Bock, M., Nicht-
erlein, T., Wehland, J. und T. Chakraborty (1995) Expression
of inlA and inlB in L. monocytogenes EGD, whose products
mediate bacterial entry into tissue culture cell lines, by
PrfA-dependent and - independent mechanisms Infect. Immun. 63:
3896-3903.

20 12. Alvarez-Dominguez, C., Carasco-Martin, E. und
Levy-Cobian F (1993) Role of complement component Clq in
phagocytosis of L. monocytogenes by murine macrophage-like
cell lines . Infect. Immun. 61: 3664-3672.

25 13. Dunne, D.W., Resnick, D., Greenberg, J., Krieger, M. und
Joiner, K.A. (1994) The type I macrophage scavenger receptor
binds to Gram-positive bacteria and recognizes lipoteichcoic
acid. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 1863-7.

30 14. Gaillard, J-L, Berche, P. und Sansonetti, PJ (1986)
Transposon mutagenesis as a tool to study the role of
hemolysin in virulence of Listeria monocytogenes Infect.
Immun. 52: 50-55.

15. Theriot, J.A., Rosenblatt, J., Portnoy, D.A., Goldschmidt-Clermont, P.J. und Mitchison, T.J. (1994) Involvement of profilin in the actin-based motility of *Listeria monocytogenes* in cells and cell-free extracts. *Cell* 76: 505-517.
- 5
16. Chakraborty, T., Ebel, F., Domann, E., Niebuhr, K., Gerstel, B., Pistor, S., Temm-Grove, CJ, Jockusch, BM., Reinhard, M., Walter, U. und Wehland, J. (1995) A focal adhesion factor directly linking intracellularly motile
10 *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii* to the actin-based cytoskeleton of mammalian cells *EMBO J.* 14: 1314-21.
17. Vazquez-Boland, J.A., Kocks, C., Dramsi, S., Ohayon, H., Goeffroy, C., Mengaud, J. und Cossart, P. (1992) Nucleotide
15 sequence of the lecithinase operon of *L. monocytogenes* and possible role of lecithinase in cell-to-cell spread. *Infect. Immun.* 60: 219-30.
18. L'Hopital, S.J., Marly, J., Pardon, P. und Berche, P.
20 (1993) Kinetics of antibody production against listeriolysin O in sheep with listeriosis. *J Clin. Microbiol.* 31: 1537-40.
19. Domann, E., Zechel, S., Lingnau, A., Hain, T., Darji, A., Nichterlein, T., Wehland, J. und Chakraborty, T. (1997)
25 Identification and characterization of a novel PrfA-regulated gene in *Listeria monocytogenes* whose product, IrpA, is highly homologous to internalin proteins, which contain leucine-rich repeats. *Infect. Immun.* 65: 101-9.
- 30 20. Grenningloh, R., Darji, A., Wehland, J., Chakraborty, T. und Weiss, S. (1997). Listeriolysin and I rpA are major protein targets of the human humoral response against *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* 65: 3976-3980, 1997.

- 42 -

21. Shen, H., Slifka, M.K., Matloubian, M., Jensen, E.R., Ahmed, R. und Miller, J.F. (1995) Recombinant Listeria monocytogenes as a live vaccine vehicle for the induction of protective anti-viral cell-mediated immunity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92: 3987-91.
- 5
22. Slifka, M.K., Shen, H., Matloubian, M., Jensen, E. R., Miller, J.F. und Ahmed, R. (1996) Antiviral cytotoxic T-cell memory by vaccination with recombinant Listeria monocytogenes. J. Virology 70: 2902-10.
- 10
23. Jensen, E.R., Selvakumar, R., Shen, H., Ahmed, R., Wettstein, F.O. und Miller J.F. (1997) Recombinant Listeria monocytogenes Vaccination Eliminates Papillomavirus-Induced Tumors and Prevents Papilloma Formation from Viral DNA. J. Virol. 71: 8467-8474.
- 15
24. Schafer, R., Portnoy, D.A., Brassell, S.A. und Paterson, Y. (1992). Induction of a cellular immune response to a foreign antigen by a recombinant Listeria monocytogenes vaccine. J. Immunol. 149: 53-9.
- 20
25. Ikonomidis, G., Paterson, Y., Kos, F.J. und Portnoy, D.A. (1994). Delivery of a viral antigen to the class I processing and presentation pathway by Listeria monocytogenes. J. Exp. Med. 180: 2209-18.
- 25
26. Frankel, F.R., Hegde S., Lieberman, J. und Paterso, Y. (1995) Induction of cell-mediated immune responses to human immunodeficiency virus type 1 Gag protein by using Listeria monocytogenes as a live vaccine vector. J. Immunol. 155: 4775-82.
- 30
35. Pan, Z.K., Ikonomidis, G., Lazenby, A., Pardoll, D. und Paterson, Y. (1995) A recombinant Listeria monocytogenes

- 43 -

vaccine expressing a model tumour antigen protects mice against lethal tumour cell challenge and causes regression of established tumours. *Nature Med.* 1: 471-7.

- 5 28. Dramsi, S., Kocks, C., Forestier, C. und Cossart, P. (1993) Internalin-mediated invasion of epithelial cells by *L. monocytogenes* is regulated by bacterial growth, temperature and the pleiotropic activato, prfA. *Mol. Microbiol.* 9: 931-41.
- 10 29. Alvarez-Dominguez, C., Vazquez-Boland, J.A., Carrasco-Marin, E., Lopez-Mato, P. und Leyva-Cobian F. (1997). Host cell heparan sulfate proteoglycans mediate attachment and entry of *Listeria monocytogenes*, and the listerial surface protein ActA is involved in heparan sulfate receptor recognition. *Infect. Immun.* 65: 78-88.
- 15 30. Domann, E., Wehland, J., Rohde, M., Pistor, S., Hartl, M., Goebel, W., Leimeister-Wächter, M., Wuenscher, M. und Chakraborty, T. (1992) A novel bacterial virulence gene in *L. monocytogenes* required for host microfilament interaction with homology to the proline rich region of vinculin. *EMBO. J.* 11: 1981-1990.
- 20 31. Kocks, C., Gouin, E., Tabouret, M., Berche, P., Ohayon, M. und Cossart, P. (1992) *Listeria monocytogenes* induced actin assembly requires the actA gene product, a surface protein. *Cell* 68: 521-31.
- 25 32. Armstrong, D. *Listeria monocytogenes* (1995) In Principle and Practice of Infectious Diseases, Eds. Mandell, Douglas und Bennett, J.E. und Dolin R.. S.1880-1885. Churchill Linvings-tone New York, 1995.
- 30 32a. Boucher, R.C. (1996). Current status of CF gene therapy. Trends in Genetics 12: 81-84.

- 44 -

32b. Bank A. (1996). Human somatic cell gene therapy. BioEssays 18: 999-1007.

5 33. O'Callaghan D, Maskell D, Tite J, Dougan G (1990). Immune responses in BALB/c mice following immunization with aromatic compound or purine-dependent *Salmonella typhimurium* strains. Immunology 69:184-189.

10 34. Tacket, C.O., Sztein, M.B., Losonsky, G.A., Wasserman, S:S., Nataro, J.P., Edelman, R., Pickard, D., Dougan, G., Chatfield, S., und Levine, M.M. (1997). Safety of Live Oral *Salmonella typhi* Vaccine Strains with deletions in htrA and aroC, aroD and immune response in humans. Infect. Immun. 65: 452-456.

15

35. Curtiss III, R. (1989) Attenuated *Salmonella* strains as live vectors for the expression of foreign antigens. In New generation vaccines: The molecular approach (ed. M.M. Levine und G. Woodrow) p. 161. Marcel Dekker, New York.

20

36. Hopkins, S., Kraehenbuhl, J.-P., Schödel, F., Potts, A, Peterson, D., De Grandi, P., und Nardeli-Haefliger, D. (1995). A recombinant *Salmonella typhimurium* vaccine induces local immunity by four different routes of immunization. Infect. Immun. 63: 3279-3286.

25 37. Berkmen, M., Benedik, MJ., und Blasi, U. (1997). The *Serratia marcescens* NucE protein functions as a holin in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 179: 6522-6524.

30

38. Diaz, E., Munthali, M., de Lorenzo, V., und Timmis KN (1994). Universal barrier to lateral spread of specific genes among microorganisms. Mol. Microbiol. 13: 855-861.

- 45 -

39. Hohmann, El., Oletta, CA., Loomis, WP, und Miller, SI (1995). Macrophage-inducible expression of a model antigen in *Salmonella typhimurium* enhances immunogenicity. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 92:2904-2908.

5

40. Park S.F. und Stewart G.S. (1990). High-efficiency transformation of *Listeria monocytogenes* by electroporation of penicillin-treated cells. Gene 94:129-132.

10 41. Premaratne, R.J., Lin, W.J. und Johnson E.A. (1991) Development of an improved chemically defined minimal medium for *L. monocytogenes*. Appl. Environ. Microbiol. 57: 3046-48.

Patentansprüche:

- 5 1. TGC-Verfahren zur Induktion einer zielgerichteten, somatischen Transgenität in einem animalen Wirt, dadurch gekennzeichnet, daß Bakterien mit einer in einen episomalen Vektor integrierten, unter der Kontrolle eukaryonter, regulatorischer Elemente zur späteren Transkription und Expression stehender Fremd DNA bei der Infektion eines ganzen Organismus im Wirt die Fremd-Gene freisetzen und damit dort die Transkription und Expression von Fremd DNA und/oder Fremd-Protein bewirken.
- 15 2. TGC-Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Bakterien bei der Infektion eines Organs durch gezielte Perfusion oder in Kultur Fremdgene freisetzen und damit die Transkription und Expression von Fremd-Nukleinsäure und/oder Fremd-Protein im Organ bewirken.
- 20 3. TGC-Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Bakterien bei der Infektion eines animalen Gewebes Fremd-Gene freisetzen und damit die Transkription und Expression von Fremd-Nukleinsäure und/oder Fremd-Protein im Gewebe bewirken.
- 25 4. TGC-Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Bakterien bei der Infektion eines Gemisches von Zellen oder einer einzelnen Zelllinie Fremd-Gene freisetzen und damit die Transkription und Expression von Fremd-Nukleinsäure und/oder Fremd-Protein in den einzelnen Zellen des Gemisches oder in der Zelllinie bewirken.
- 30 5. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch geeignet ist, daß die durch die bakterielle Infektion in den Wirts-
- 35

- 47 -

organismus eingeführte Fremd-DNA dort die Bildung eines dem Wirtsorganismus fehlenden oder fremden Proteins veranlaßt oder durch die Bildung von einzel- oder doppelsträngiger Nukleinsäure die Bildung eines Proteins oder die Wirkung einer 5 Nukleinsäure im Wirtsorganismus erhöht, vermindert oder verhindert.

6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die durch die bakterielle Infektion in den Wirtsorganismus 10 eingeführte Fremd-DNA

- a) zur somatischen Gentherapie oder
- b) zum immunologischen Schutz vor mikrobiellen Erregern oder
- c) zum immunologischen Schutz vor Tumorerkrankungen

eingesetzt und prophylaktisch oder therapeutisch wirkt.

7. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß Bakterien der Gattungen Aeromonas, Bartonella, Brucella, Campylobacter, Clostridia, Enterobacteriaceae, Legionella, Listeria, Mycobacterium, Renibacterium, Rhodococcus 25 oder Bakterien aus mit ihnen genetisch oder biochemisch verwandten Gattungen eingesetzt werden, die im eukaryonten Wirtsorganismus intrazellulär lebensfähig sind.

8. Verfahren gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß 30 die Bakterien durch Auswahl und genetische Manipulation endogener bakterieller Pathogenität-assozierter Gene, vorzugsweise in ihrer in vivo-Pathogenität derart abgeschwächt oder gestärkt werden, daß die Bakterien

- 35 a) in definierte Organe des Gesamtorganismus,

- 48 -

- b) in bestimmte Gewebe des Wirtsorganismus oder
 - c) in bestimmte Kompartimente von Zellen
- 5 vordringen und dort die Fremd-DNA freisetzen.
9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den manipulierten Bakterien um Listerien handelt.
- 10 10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den manipulierten Bakterien um Listerien mit den Hinterlegungsnummern DSM 11 881 und DSM 11 882 handelt.
- 15 11. Verfahren gemäß den Ansprüchen 9 und 10, dadurch gekennzeichnet, daß in den Bakterien die Gene der im Sequenzprotokoll genannten SEQ ID Nr. 1 und SEQ ID Nr. 2 oder Gene, die mit ihnen mindestens in 35% der Nukleotidpositionen übereinstimmen, genetisch mutiert, deletiert oder blockiert sind.
- 20 12. Bakterienstamm für das TGC-Verfahren zur Induktion einer zielgerichteten, somatischen Transgenität, dadurch gekennzeichnet, daß in ihm die im Vektor integrierte und zur späteren Transkription und Expression vorbereitete Fremd-DNA unter der Kontrolle regulatorischer Elemente steht, die aus dem zu infizierenden Zielorgan stammen oder auf dieses Zielorgan ausgerichtet sind.
- 25 30 13. Bakterienstamm nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß er zu einem Sicherheitsstamm mutiert worden ist, indem er durch eine Mutation in einem Gen sein Wachstum nicht mehr an die Umweltbedingungen anpassen kann (cspl Mutante DSM 11 883) und/oder durch eine auxotrophe Mutation entsprechend SEQ ID No. 1 und/oder durch eine Mutation im Sinne der endogenen Attenuation (Stämme DSM 11 881 und 11 882) und/oder durch die

zusätzliche Ausstattung mit einem exogenen Suizidgen genetisch verändert wird.

14. Bakterienstamm nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet,
5 daß er zu einem Sicherheitsstamm mutiert ist, in dem

- a) das cspl-Gen gemäß Sequenzprotokoll SEQ ID No. 2 oder ein mit ihm in mindestens 35% der Nukleotidpositionen übereinstimmendes Gen mutiert oder blockiert ist oder
10
- b) das cspl-Gen deletiert ist (Stamm DSM 11883),
- c) das dapE-Gen gemäß Sequenzprotokoll SEQ ID No. 1 oder ein mit ihm in mindestens 35% der Nukleotidpositionen übereinstimmendes Gen deletiert oder blockiert ist oder
15
- d) das actA-Gen und/oder das plcB-Gen und/oder das hly-Gen oder andere an der Virulenz beteiligte Gene mutiert, deletiert oder blockiert sind.
20

15. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den manipulierten Bakterien um Salmonellen handelt, insbesondere um Salmonellen des Stammes mit der Hinterlegungsnummer ATCC14028 oder um Abkömmlinge dieses Stammes die gemäß dem Anspruch 14 genetisch verändert sind, handelt.
25

30 16. Verfahren gemäß Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Bakterien durch eine Mutation im aroA-Gen, hinterlegt in der Genebank Sequenz M 10947, auxotroph sind.

35 17. Verfahren gemäß Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den genetisch manipulierten Bakterien um apathoge-

- 50 -

ne Listerien, um apathogene oder fakultativ pathogene Enterobacteriaceae oder andere apathogene Bakterien handelt.

18. Verfahren zur Transfektion von animalen Zellen durch
5 Fremd-DNA, dadurch gekennzeichnet, daß die Bakterien als Träger der Fremd-DNA im Cytoplasma

- a) wegen einer auxotrophen Mutation nicht lebensfähig sind;
- 10 b) wegen eines fremden Suizidgens nicht lebensfähig sind;
- c) in die Endosomen der Zellen eindringen, dieses Kompartiment aber nicht verlassen können und dort lysiert werden;
- 15 d) in Phagolysosomen aufgenommen werden, diese Kompartimente lysieren und ins Cytoplasma eindringen; und
- 20 e) durch Behandlung mit Antibiotika zerstört werden

und dadurch die Fremd-DNA freisetzen.

25 19. Verfahren zur Herstellung eines vorbestimmten Fremd-Proteins, dadurch gekennzeichnet, daß eine ausgewählte Zelle, ein ausgewähltes Gewebe oder ein Organ gezielt bakteriell infiziert und dort die Bildung des vorbestimmten Proteins initiiert wird und anschließend das Fremd-Protein aus der Zelle, dem Gewebe oder dem Organ isoliert und gereinigt wird.

30 20. Verfahren nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß die Expression von Fremd-Protein im Euter von Milch produzierenden Tieren oder in Eiern von Geflügeltieren oder im Blut

oder anderen Geweben von Nutztieren durch Infektion mit Bakterien induziert wird.

21. Transgenes Nutztier, dadurch gekennzeichnet, daß alle 5 Zellen seines Organismus oder die Zellen eines oder mehrerer seiner Gewebe oder Organe durch Anwendung des Verfahrens nach Anspruch 1 genetisch verändert sind.
22. Verfahren zur Induktion einer somatischen Transgenität 10 gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß das somatisch transgene Gewebe einem Gesamtorganismus reimplantiert und der lebende Gesamtorganismus auf diese Weise somatisch transgen wird.

SEQUENZPROTOKOLL

5 ALLGEMEINE ANGABEN

10 ANMELDER: 1. Privatdozent
Dr. Christoph von Eichel-Streiber
Bingerweg 15
55444 Schweppenhausen
Bundesrepublik Deutschland
Tel.: 06724/33 98
Fax : 06724/33 98

15

25 BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG:

TGC-Verfahren zur Induktion einer zielgerichteten, somatischen Transgenität

30 ANZAHL DER SEQUENZEN: 2

35 ZUSTELLANSCHRIFT : Patentanwälte
Dr. Rainer A. Keil
Ludwig R. Schaafhausen
Nanno M. Lenz
Dr. K.-H. Meyer-Dulheuer
Eysseneckstraße 31
D-60322 Frankfurt am Main

COMPUTERLESBARE FASSUNG

DATENTRÄGER : Diskette
COMPUTER : IBM PC compatible
5 OPERATING SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
SOFTWARE : Word Perfect 6.0

Angaben zur Sequenz ID-No 1:

10 Länge : 1260 Basenpaare
Art : Nukleinsäure und davon abgeleitete Aminosäuresequenzen
Strangform : Einzelstrang
Topologie : linear
15 Herkunft : Listeria monocytogenes Stamm EGD Serotyp 1/2a
Merkmal : Sequenz des dapE Gens, das eines der für die Synthese der Diaminopimelinsäure notwendigen Schlüsselenzyme ist. Die Aminosäure sequenz ist hoch homolog zu N-succinyl-L-diaminopimelic acid desuccinylase (dapE) unter anderem aus Escherichia coli, Bacillus subtilis, Lactobacillus spp., Mycobacterium tuberculosis.
20
25

Aminosäuresequenz: 318 Aminosäuren
Nukleotidsequenz : 1260 Nukleotide

30

1 TGCCTTATA GAGAACGGGA AAACATAGAG TGGAATTCAAT AGAAAGAGGG
51 CGTGAAATAT GGACCAACAA AAAAAGATTC AAATTTAAA GGACTTGGTA
101 AATATTGATT CGACTAATGG GCATGAAGAA CAAGTTGCGA ACTATTTGCA
151 AAAGTTGTTA GCTGAACATG GTATTGAGTC CGAAAAGGTA CAATACGACC

201 TAGACAGAGC TAGCCTAGTA AGCGAAATTG GTTCCAGTAA CGA GAA GGT T
R E G
251 TG GCA TTT TCA GGG CAT ATG GAT GTA GTT GAT GCG GGT GAT GTA TCT AAG
L A F S G H M D V V D A G D V S K -
5 301 TGG AAG TTC CCA CCT TTT GAA GCG ACA GAG CAT GAA GGG AAA CTA TAC GG
W K F P P F E A T E H E G K L Y G -
351 A CGC GGC GCA ACG GAT ATG AAG TCA GGT CTA GCG GCG ATG GTT ATT GCA A
R G A T D M K S G L A A M V I A -
401 TG ATT GAA CTT CAT GAA GAA AAA CAA AAA CTA AAC GGC AAG ATC AGA TTA
M I E L H E E K Q K L N G K I R L -
451 TTA GCA ACA GTT GGG GAA GAG ATC GGT GAA CTT GGA GCA GAA CAA CTA AC
L A T V G E E I G E L G A E Q L T -
501 A CAA AAA GGT TAC GCA GAT GAT TTA CAT GGT TTA ATC ATC GGC GAA CGC A
Q K G Y A D D L H G L I I G E P -
15 551 GT GGA CAC AGA ATC GTT TAT GCG CAT AAA GGT TCC ATT AAT TAT CCC GTT
S G H R I V Y A H K G S I N Y P V -
601 AAA TCC ACT GGT AAA AAT GCC CAT AGT TCG ATG CCG GAA TCT GGT GTG AA
K S T G K N A H S S M P E S G V N -
651 T GCG ATT GAT AAC TTG CTG CTA TTT TAT AAT GAA GTA GAA AAA TTC GTG A
A I D N L L L F Y N E V E K F V -
701 AA TCA GTT GAT GCT ACT AAC GAA ATA TTA GGC GAT TTT ATT CAT AAT GTC
K S V D A T N E I L G D F I H N V -
751 ACC GTA ATT GAT GGT GGA AAT CAA GTC AAT AGT ATC CCT GAA AAA GCA CA
T V I D G G N Q V N S I P E K A Q -
20 801 A CTG CAA GGG AAT ATT CGC TCG ATT CCA GAA ATG GAT AAT GAA ACA GTG A
L Q G N I R S I P E M D N E T V -
851 AA CAA GTG CTA GTG AAG ATT ATC AAT AAG TTA AAC AAA CAG GAA AAT GTG
K Q V L V K I I N K L N K Q E N V -
901 AAT CTG GAA TTA ATA TTT GAT TAT GAT AAA CAA CCA GTA TTT AGT GAT AA
N L E L I F D Y D K Q P V F S D K -
951 A AAT TCG GAT TTA GTC CAC ATT GCT AAG AGC GTA GCA AGC GAC ATT GTC
N S D L V H I A K S V A S D I V
1001 AAA GAA GAA ATC CCA TTA CTC GGT ATT TCC GGA ACA ACC GAT GCA GCA GA
K E E I P L L G I S G T T D A A E -
35 1051 A TTT ACC AAA GCT AAG AAA GAG TTC CCA GTG ATT ATT TTT GGA CCA GGA A
F T K A K K E F P V I I F G P G -
1101 AC GAA ACC CCT CAC CAA GTA AAC GAA AAT GTT TCT ATA GGA AAT TAT TTG
N E T P H Q V N E N V S I G N Y L -
1151 GAG ATG GTA GAT GTT TAC AAA CGG ATT GCC ACC GAG TTT TTA TCT TGA TGA
E M V D V Y K R I A T E F L S STOP

1201 AACTTTAACT TTACTTATTT CCCGATATAA AATAAGTAAT TAATAGAAGT
 1251 CTAGTATTG 1260

5 Angaben zur Sequenz ID-No 2:

Länge	:	1337 Basenpaare
Art	:	Nukleinsäure und davon abgeleitete Aminosäuresequenzen
10 Strangform	:	Einzelstrang
Topologie	:	linear
Herkunft	:	Listeria monocytogenes Stamm EGD 1/2a
Merkmal	:	Sequenz des "cold shock proteins" cspL; dieses Protein ist für die Lebensfähigkeit der Listerien bei niedrigen Temperaturen essentiell.
15		
Aminosäuresequenz:		66 Aminosäuren
20 Nukleotidsequenz :		1337 Nukleotide

1	GAGGCAAGTG GACTAACAT AAAGTTTTG GCGATGCAAC TGCGATTTG
51	GCAGGGAGATG CTTTACTAAC GCTCGCTTT TCTATTTAG CTGAAGACGA
25 101	TAATTATCT TTTGAGACAC GCATTGCTT GATTAACCAA ATTAGTTTA
151	GTAGCGGTGC AGAAGGAATG GTTGGTGGTC AACTTGCAGA CTTGGAAGCG
201	GAAAACAAAC AACTGACGCT AGAAGAGTTA TCATCCATTC ATGCACGAAA
251	AACGGGTGAA TTATTAATTG ATGCTGTAAC CTCTGCAGCA AAAATTGCGG
301	AAGCTGATCC AGAACAAACG AAACGCTTAC GAATTTTGC AGAGAATATT
350 351	GGGATTGGAT TTCAAATTAG CGACGATATT TTAGATGTAAT TTGGTGATGA
401	AACGAAAATG GGTAAAAAGA CAGGGGCCGA CGCTTTCTG AATAAAAGTA
451	CCTATCCCAG ATTACTCACG CTTGATGGGG CAAAAAGGGC ATTAAATGAG
501	CATGTTACGA TTGCAAAGTC AGCGCTTCA GGGCATGATT TCGATGATGA
551	AATTCTCTTG AAACTTGCTG ATTTAACCGC ACTTAGAGAA AATTAATCAT
35 601	AATTATCTAG TAATTCAAA ATTTTCAC ATATATAATT CAAATTGATT
651	TGCTTTCCCT AAAATACCGT GTTATACTAA TGTAAGATTA TTTTGCGGG
701	TGAAAGATAC GATTGTGAAC AACTTCCAT CTCGTGCCGT TAAGCAAGAA

751 TAGTAAATAA TTAGTGTGCA TAACACACGA GGAGGAACAT GAAC ATG GAA
M E
801 CAA GGT ACA GTA AAA TGG TTT AAC GCA GAA AAA GGA TTT GGT TTT ATC GA
Q G T V K W F N A E K G F G F I E
5 851 A CGC GAA AAC GGT GAC GAT GTA TTC GTA CAT TTC AGC GCT ATC CAA GGC G
R E N G D D V F V H F S A I Q G
901 AC GGA TTC AAA TCT TTA GAC GAA GGT CAA GCA GTA ACT TTC GAC GTT GAA
D G F K S L D E G Q A V T F D V E
951 GAA GGC CAA CGC GGA CCT CAA GCA GCT AAC GTT CAA AAA GCG TAA TTC TA
10 E G Q R G P Q A A N V Q K A STOP

1001 TTTTTGAAAT AAGAAAAAGC AAATCATTTG GGTGATTG TTTTTTATTT
1051 GTCTAAAATT ATTTTACCTT GTTGTTTA ATGGCGATTG TTTGCTATAA
1101 TAAGAACAAAT TAATCGAGAA AAAAGACCTT GCACGCATTC ATGCGAGTGG
15 1151 CTCTTGAA AGTGAGTTGT TTTTATTTGG ATCTTTAAA GATAAAGGAT
1201 CCTTCCTTA TGAAGCGATT GGATATACAA GAATTAGAAG CACTTGCAGC
1251 GGATATTCGC GCTTTTTAA TTACTTCTAC ATCTAAATCA GGTGGGCATA
1301 TTGGTCCGAA TCTTGGTGTG GTAGAACTAA CGATTGC